

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

**Mesenteriale Ischämie/Reperfusion: Einfluss des Katalasemimetikum-
Vorläufers TAA-1 und des Lösungsmittels DMSO auf die
Dünndarmschädigung und die systemischen Effekte der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Dawina Céline Wagener
aus Moers

2016

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. rer. nat. F. Petrat
2. Gutachter:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Hermann
Tag der mündlichen Prüfung:	4. Oktober 2016

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen zur Fachdiskussion vorgestellt:

Vorträge

Dawina Wagener: *Protektion durch den Katalase-Mimetikum-Vorläufer TAA-1*; Arbeitstreffen „Mesenteriale Ischämie“, 16. und 17. Juli 2008, Marienthal

Dawina Wagener: *Mesenteriale Ischämie: Protektion durch den Katalase-Mimetikum-Vorläufer TAA-1*; 14. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“, 27. bis 29. November 2008, Xanten

Dawina Wagener: *Protektion durch den Katalasemimetikum-Vorläufer TAA-1, DMSO?*; 2. Arbeitstreffen „Protektion und Regeneration“, 9. und 10. Oktober 2009, Marienthal

Dawina Wagener: *Dünndarm-Protektion vor mesenterialer Ischämie/Reperfusion: In vivo-Versuche mit dem Katalase-Mimetikum-Prodrug TAA-1 und dem Lösungsmittel DMSO*; 15. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“, 26. bis 28. November 2009, Xanten

Posterpräsentation

Dawina Wagener: *Dünndarm-Protektion vor mesenterialer Ischämie/Reperfusion: in vivo-Versuche mit dem Katalase-Mimetikum-Prodrug TAA-1 und dem Lösungsmittel DMSO*; „Forschungstag der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen“, 20. November 2009, Essen

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen (IFORES-Promotionsprogramm).

„Ich versichere an Eides statt, dass ich bei der Anfertigung und Abfassung meiner Dissertation keine unerlaubte fremde Hilfe und keine anderen als die in der Abhandlung angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner versichere ich an Eides statt, dass ich noch keinen fehlgeschlagenen Versuch unternommen habe, den Doktorgrad der Medizin, Medizinwissenschaft oder Zahnmedizin zu erlangen. Weiter versichere ich an Eides statt, den hier beantragten Dokortitel anderweitig noch nicht erworben zu haben.“

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	8
1.1 Mesenteriale Ischämie	8
1.1.1 Blutversorgung des gastrointestinalen Traktes	8
1.1.2 Mikroskopische Anatomie des gastrointestinalen Traktes.....	9
1.1.3 Anatomie- und Gefäßversorgung des gastrointestinalen Traktes der Ratte	10
1.1.4 Definition der mesenterialen Ischämie	10
1.1.5 Akute mesenteriale Ischämie.....	12
1.1.6 Pathomechanismen der Ischämie und Reperfusion	14
1.2 Eisenchelatoren	17
1.3 Katalase.....	20
1.4 TAA-1	21
1.5 Dimethylsulfoxid (DMSO)	23
1.6 Problemstellung	26
1.7 Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte	28
2.1.2 Operations-/Messmaterial.....	29
2.1.3 Medikamente.....	30
2.1.4 Chemikalien.....	30
2.1.5 Synthese und Charakterisierung von TAA-1	31
2.1.5 Computerprogramme.....	31
2.2 Versuchstiere	32

2.3 Methoden.....	32
2.3.1 Tiermodell.....	32
2.3.1.1 Anästhesiologisches und operatives Basisvorgehen.....	32
2.3.1.2 Teststoffapplikation in den Vorversuchen	34
2.3.1.3 Teststoffapplikation in den Hauptversuchen	35
2.3.2 Messungen und Bestimmungen.....	37
2.3.2.1 Biomonitoring der Vitalparameter.....	37
2.3.2.2 Blutgasanalysen und Enzymaktivitäten im Blutplasma.....	37
2.3.2.3 Lokale Quantifizierung der Darmschädigung	38
2.3.2.3.1 Beurteilung des makroskopischen Zustandes des Dünndarms	38
2.3.2.3.2 Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Dünndarmhomogenates...	39
2.3.2.3.3 Bestimmung der TBARS im Dünndarmhomogenat	40
2.3.2.3.4 Histologische Beurteilung der Schädigung des Dünndarmes	41
2.3.2.3.5 Histologische Bestimmung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten.....	42
2.3.3 Versuchsansätze und Versuchsplanung	43
2.3.3.1 Versuchsgruppen der Vorversuche.....	43
2.3.3.2 Versuchsgruppen der Hauptversuche.....	43
2.3.4 Statistische Methoden	44
3. Ergebnisse	44
3.1 Vorversuche.....	44
3.1.1 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf Vitalparameter und Veränderungen von Plasmaenzymaktivitäten während mesenterialer Ischämie/Reperfusion	45
3.1.1.1 Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck	45
3.1.1.2 Einfluss auf Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körpertemperatur	46
3.1.1.3 Einfluss auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), Alanin- Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Blutplasma.....	47

3.1.2 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die lokalen Schädigungsparameter des Dünndarmes	49
3.1.2.1 Einfluss auf den Makroscore.....	49
3.1.2.2 Einfluss auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmhomogenates	50
3.1.2.3 Einfluss auf die histologische Schädigung des Dünndarmes	51
3.2 Hauptversuche.....	52
3.2.1 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf Vitalparameter, Parameter der Blutgasanalyse und Veränderungen von Plasmaenzymaktivitäten während mesenterialer Ischämie/Reperfusion.....	52
3.2.1.1 Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck	52
3.2.1.2 Einfluss auf Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körpertemperatur	54
3.2.1.3 Einfluss auf die Parameter der Blutgasanalyse und metabolische Parameter.....	55
3.2.1.4 Einfluss auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blutplasma.....	62
3.2.2 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die lokalen Schädigungsparameter des Dünndarmes	64
3.2.2.1 Einfluss auf die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Dünndarmgewebe	64
3.2.2.2 Einfluss auf die Bildung von TBARS im Dünndarmgewebe.....	64
3.2.2.3 Einfluss auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmhomogenates	65
3.2.2.4 Einfluss auf den Makroscore.....	66
3.2.2.5 Einfluss auf die histologische Schädigung des Dünndarmes	67

4.	Diskussion	67
4.1	Vorversuche und erforderliche methodische Modifikationen.....	68
4.2	Ergebnisse der Hauptversuche	69
4.2.1	TAA-1-induzierte Effekte.....	71
4.2.1.1	Protektion durch TAA-1 vor mesenterialer Ischämie/Reperfusion	71
4.2.1.2	Toxizität von TAA-1 und Protektion durch DMSO vor TAA-1-induzierter Toxizität	74
4.2.2	DMSO-induzierte Effekte	78
4.2.2.1	Protektion durch DMSO vor mesenterialer Ischämie/Reperfusion	78
4.2.2.2	Toxizität durch DMSO durch Induktion von Hämolyse	86
4.5	Limitationen der Arbeit	88
4.6	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis	91
7	Abkürzungsverzeichnis	98
8	Danksagung	99
9	Curriculum vitae	100

1. Einleitung

1.1 Mesenteriale Ischämie

1.1.1 Blutversorgung des gastrointestinalen Traktes

Der gastrointestinale Trakt wird hauptsächlich über drei große Gefäße versorgt (Abbildung 1). Der *Truncus coeliacus* versorgt Magen, Leber, Milz, Bauchspeicheldrüse und Zwölffingerdarm (*Duodenum*), die *Arteria (A.) mesenterica superior* versorgt neben der Bauchspeicheldrüse den Dünndarm, sowie *Colon ascendens* und einen Teil des *Colon transversum*; die *A. mesenterica inferior* versorgt den restlichen Teil des Querkolons, *Colon descendens* und *sigmoideum* bis hin zum Rektum [Yeo et al., 2007].

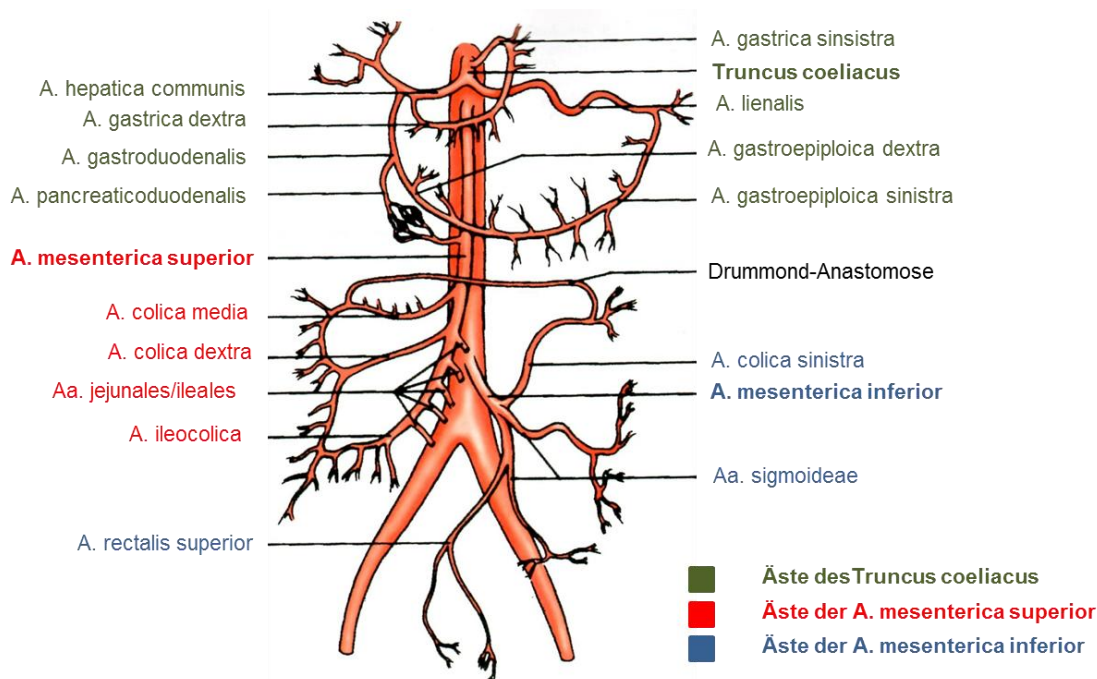


Abbildung 1: Mesenteriale Gefäßversorgung des Menschen (modifiziert nach [Yeo et al., 2007]).

Zwischen diesen einzelnen Gefäßen gibt es mehrere Gefäßverbindungen, auch Anastomosen genannt. Diese sind von großer Relevanz, da sie eine kompensatorische Durchblutung in den Randbereichen erlauben, wenn eine der großen Arterien nicht durchblutet ist [Yeo et al., 2007]. Wichtig sind insbesondere die Drummond¹- und die Riolan²-Anastomosen: beide stellen eine Verbindung zwischen der *A. colica media* (aus der *A. mesenterica superior*) und der *A. colica sinistra* (aus der *A. mesenterica inferior*) her, wobei die Drummond-Anastomose direkt am Kolonbogen entlang- und die Riolan-Anastomose etwas entfernt von der Darmwand im Mesenterium verläuft. Als anatomische

¹ Nach Sir David Drummond (1852 – 1932), Pathologe.

² Nach Jean Riolan (1580 – 1657), Anatom.

Variation können diese Verbindungen auch identisch sein. Außerdem gibt es die Böhlersche ³ -Anastomose, die die *A. mesenterica superior* über die *A. pancreaticoduodenalis* mit dem *Truncus coeliacus* verbindet [Chow *et al.*, 2002]. Die Kollateralen können jedoch den Verschluss einer Arterie nur dann kompensieren, wenn die Erkrankung langsam voranschreitet bzw. die Perfusion langsam abnimmt. Bei einem akuten Verschluss kann eine adäquate Perfusion durch die Kollateralen oft nicht gewährleistet und eine Ischämie somit nicht verhindert werden. Statt zu einer kompletten Ischämie kommt es zu einer low-flow Ischämie mit geringer Restperfusion [Yeo *et al.*, 2007].

1.1.2 Mikroskopische Anatomie des gastrointestinalen Traktes

Etwa 70% des Blutflusses des gastrointestinalen Traktes ist für die Mukosa und Submukosa bestimmt (Abbildung 2; [Bradbury, 1995; Oldenburg *et al.*, 2004]). Dementsprechend ist die Mukosa bei Mangel durchblutung die vulnerabelste Schicht [Yeo *et al.*, 2007].

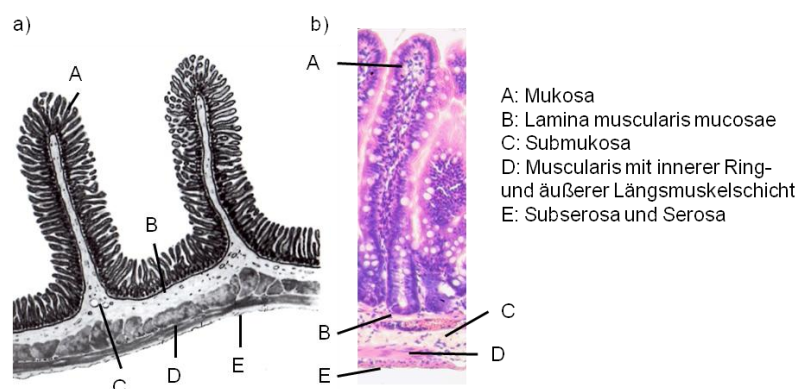


Abbildung 2: Mikroskopische Anatomie des Jejunums. a) Schematische Darstellung (modifiziert nach [Benninghoff und Drenckhahn, 2008]); b) mikroskopisches Bild eines Rattendünndarmes (Originalvergrößerung 200x).

Bereits nach wenigen Minuten kann man erste Schäden der obersten Mukosaschicht und dabei vor allem im apikalen Bereich der Villi erkennen [Bradbury, 1995; Chiu *et al.*, 1970; Mallick *et al.*, 2004]. Bald darauf verliert der Darm seine Barrierefunktion, was zum Darmwandödem, bakterieller Translokation ins Blutssystem und Flüssigkeitsverlust ins Darmlumen führt. Solange nur die Mukosa und Submukosa betroffen sind, ist der Schaden noch reversibel – sobald der Infarkt sich bis in die Muskularis und Serosa

³ Nach Anton Bühler (1869 – 1959), Anatom.

erstreckt - welche die übrigen 30% des Blutflusses erhalten - ist eine Regeneration nicht mehr möglich [Yeo *et al.*, 2007].

1.1.3 Anatomie- und Gefäßversorgung des gastrointestinalen Traktes der Ratte

Die Anatomie und Gefäßversorgung des gastrointestinalen Traktes der Ratte und des Menschen sind ähnlich. Nach der Passage der Nahrung durch Magen, *Duodenum*, *Jejunum* und *Ileum* fällt lediglich ein sehr prominentes - und makroskopisch dem Magen ähnliches - Zökum auf, bevor sich die Passage der Nahrung in das Kolon fortsetzt [Baker *et al.*, 1979; Hebel und Stromberg, 1986]. Wie beim Menschen erfolgt die hauptsächliche Blutversorgung des Dün- und Dickdarms über Äste der *A. mesenterica superior* ([Hebel und Stromberg, 1986]; Abbildung 3).

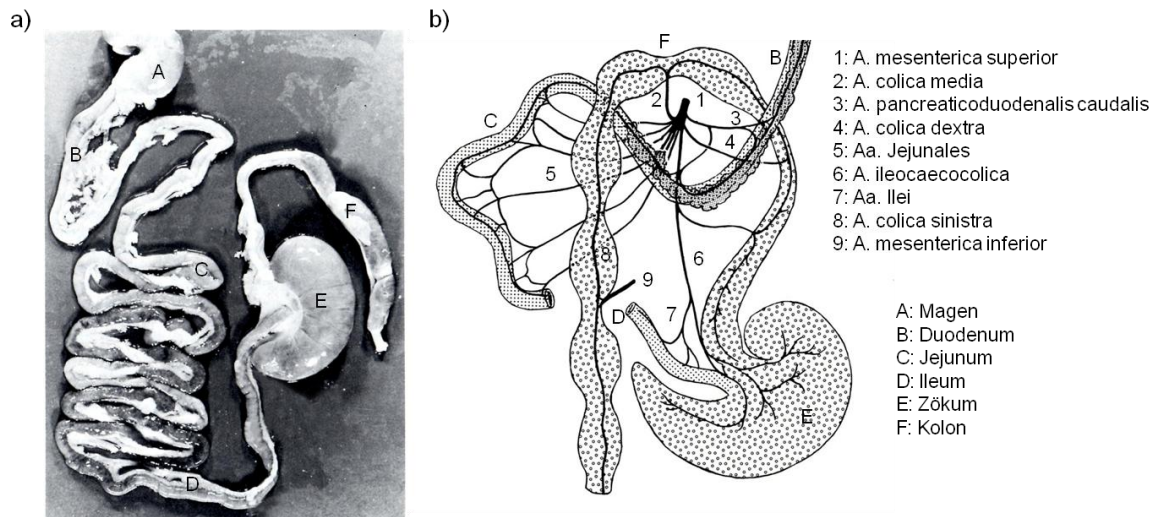


Abbildung 3: a) Anatomie des gastrointestinalen Traktes (modifiziert nach [Baker *et al.*, 1979]) der Ratte und b) dessen Gefäßversorgung (modifiziert nach [Hebel und Stromberg, 1986]).

1.1.4 Definition der mesenterialen Ischämie

Der Begriff Ischämie (I) stammt aus dem Griechischen (ἴσχειν: is-chein „zurückhalten“ und αἷμα: haima „Blut“ [Pschyrembel und Dornblüth, 2004]), bedeutet sinngemäß „Blutleere“ und beschreibt die Minderdurchblutung eines Organs oder Gewebes [Böcker *et al.*, 2004]. Dabei wird eine relative Ischämie mit einer mangelhaften Durchblutung von einer absoluten Ischämie mit völlig fehlender Durchblutung unterschieden, es kommt zu einem Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und –angebot [Böcker *et al.*, 2004].

Die Ischämie eines Organes kann vielerlei Ursachen haben. Es gibt lokale Auslöser, die ihren Ursprung direkt am zuführenden Gefäß haben. Dazu zählen Atherosklerose und die

damit verbundene Einengung von Gefäßen durch Plaques oder arterielle Thrombosen [Böcker *et al.*, 2004]. Weiterhin zählen hierzu auch arterielle Embolien, die z.B. durch Thrombusbildung im Vorhof des Herzens bei nicht therapiertem Vorhofflimmern, Endokarditis oder Herzklappenfehlern entstehen. Auch Kompressionen von außen durch Nachbarstrukturen wie z.B. Tumore können zur Verlegung eines Gefäßes führen [Böcker *et al.*, 2004]. Des Weiteren gibt es auch funktionelle Ursachen einer Ischämie, wie z.B. Vasospasmen, ausgelöst durch Medikamente oder endogene Reize [Yeo *et al.*, 2007].

Neben den lokalen führen auch systemische Ursachen zu einer Ischämie. Dazu gehören Blutdruckabfälle (Hypotonien) z.B. im Rahmen eines Herzinfarktes mit Kreislaufversagen, im hypovolämischen oder septischen Schock sowie bei kardiochirurgischen Operationen [Böcker *et al.*, 2004; Mallick *et al.*, 2004]. Hier wird von einer nonokklusiven mesenterialen Ischämie gesprochen [Oldenburg *et al.*, 2004]. Zudem gibt es noch die Mesenterialvenenthrombose, die als Begleiterkrankung bei malignen Tumoren, intraabdominaler Sepsis, Pankreatitis oder bei Blutgerinnungsstörungen auftritt. Sie ist die seltenste Form, schreitet eher langsam fort und verursacht vor allem hämorrhagische Infarkte und Ödeme der Darmwand [Cerqueira *et al.*, 2005; Oldenburg *et al.*, 2004]. Besteht eine Ischämie über längere Zeit, können in Abhängigkeit der Sauerstoffmangeltoleranz des Gewebes Infarkte entstehen, welche Nekrosen - also den Zelltod - des entsprechenden Gewebes bedeuten [Böcker *et al.*, 2004]. Es wird zwischen anämischem und hämorrhagischem Infarkt unterschieden, wobei bei anämischen Infarkten Endarterien betroffen sind: das nachfolgende Gewebe erscheint blutleer [Böcker *et al.*, 2004]. Bei Blutversorgung eines Gewebes durch mehr als eine Arterie kann es zu hämorrhagischen Infarkten kommen: so kann bei dem Verschluss einer zuführenden Arterie neben einer Nekrose zusätzlich eine Blutung aus einer weiteren, unverschlossenen Arterie auftreten. Da im Gastrointestinaltrakt die peripheren Darmarterien über Kollateralen miteinander verbunden sind (Kapitel 1.1.1), entsteht bei dem Verschluss eines größeren Arterienastes eine Nekrose, in die es über Kollateralarterien zusätzlich randständig einblutet [Böcker *et al.*, 2004].

Nicht nur die Ischämie als solche hat ein großes Schädigungspotential: auch die anschließende Reperfusion (R) - z.B. durch Wiedereröffnung des Gefäßes - birgt paradoxerweise (trotz der wiederhergestellten Sauerstoffversorgung des Gewebes) Risiken. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS: **R**eactive **O**xygen **S**pecies, Radikalen; Kapitel 1.1.6) und anderen toxischen Gewebeprodukten wie auch das Einschwemmen von großen Mengen an Kalium in den Kreislauf kann eine Herz-/Kreislaufdepression, disseminierte intravasale Gerinnung und schließlich ein Multiorganversagen zur Folge haben [Yeo *et al.*, 2007].

Bei der mesenterialen Ischämie handelt es sich um eine oft lebensbedrohliche Perfusionsstörung des gastrointestinalen Traktes. Dabei werden zwei Formen unterschieden: die akute und die chronische Form. Beiden Formen ist gemeinsam, dass sie durch eine diffuse Symptomatik häufig erst spät bemerkt werden und so therapeutische Optionen meist limitiert sind [Yeo *et al.*, 2007].

1.1.5 Akute mesenteriale Ischämie

Die akute mesenteriale Ischämie ist ein gefäßchirurgischer Notfall [Oldenburg *et al.*, 2004], der nur dann suffizient therapiert werden kann, wenn frühzeitig an das Krankheitsbild gedacht und eine zielführende Diagnostik durchgeführt wird [Müller, 2008/2009]. Outcome und Überlebenswahrscheinlichkeit sind stark abhängig von der rechtzeitigen Therapie und auch heute noch schlecht [Yeo *et al.*, 2007]. Zahlen über die Mortalität dieser Erkrankung schwanken von 24 bis 100%, durchschnittlich überleben 69% der Patienten die Erkrankung nicht [Cudnik *et al.*, 2013; Müller, 2008/2009; Oldenburg *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2007]. Die Inzidenz der akuten mesenterialen Ischämie wird auf 2 - 9/100 000/Jahr geschätzt, mit steigender Tendenz. Das Risiko, eine akute mesenteriale Ischämie zu erleiden steigt mit zunehmendem Lebensalter [Müller, 2008/2009; Yeo *et al.*, 2007]. Vor allem nach kardiochirurgischen Operationen sowie auf Intensivstationen wird die mesenteriale Ischämie regelmäßig gefunden [Bolcal *et al.*, 2005; Leone *et al.*, 2015].

Entscheidend ist vor allem die zügige Diagnose, die dadurch erschwert wird, dass die Patienten oft nur unspezifische klinische Symptome aufweisen, wie z.B. abdominelle Schmerzen, (blutiger) Durchfall oder Übelkeit [Oldenburg *et al.*, 2004]. Andere Erkrankungen wie Pankreatitis, gastrointestinale Blutung, Darmverschluss (Ileus) oder Peritonitis können ähnliche Symptome verursachen und ebenfalls zum Krankheitsbild des akuten Abdomens führen. Wichtig ist vor allem die genaue Anamnese, die ein besonderes Augenmerk auf Risikofaktoren wie höheres Alter, bekanntes Vorhofflimmern, Herzinsuffizienz oder Zustand nach kardiochirurgischer Operation richten sollte. Bauchschmerzen nach dem Essen und Gewichtsverlust können als besondere Hinweise für die chronische Form dienen [Oldenburg *et al.*, 2004]. Laborchemische Veränderungen sind ebenfalls oft unspezifisch. Eventuell fallen eine Hämokonzentration durch Hypovolämie (u.a. durch Flüssigkeitsverluste in das Darmlumen), eine Leukozytose, eine Laktaterhöhung und/oder eine metabolische Azidose auf. Gelegentlich kommt es auch zu deutlichen Erhöhungen der Aktivitäten der Plasmaenzyme Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat-Aminotransferase (AST) oder Kreatinkinase [Oldenburg *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2007]. Neuere serologische Marker zur früheren und spezifischeren Identifikation der

mesenterialen Ischämie sind Gegenstand aktueller Studien. Dabei wurden bislang vor allem D-Laktat, Gluthation-S-Transferase, Lipopolysaccharid und das intestinale Fatty Acid-Binding Protein (I-FABP) auf ihre diagnostische Präzision untersucht [Khadaroo et al., 2014; Mensink et al., 2009] und als vielversprechende Marker identifiziert, auch wenn verlässliche Daten mit höheren Fallzahlen noch fehlen. Während D-Laktat als Stereoisomer des L-Laktats vor allem von Bakterien wie *Escherichia coli* im Darmlumen produziert wird, findet man das intestinale Fatty Acid-Binding Protein im Zytoplasma von reifen Enterozyten an der Villusspitze. Die dortigen Enterozyten reagieren am empfindlichsten auf Sauerstoffmangel und setzen das intestinale Fatty Acid-Binding Protein bei Ischämie in den Blutkreislauf frei [Khadaroo et al., 2014]. Hyperkaliämie oder Hyperphosphatämie sind dagegen sehr späte Zeichen und signalisieren bereits eine Nekrose des Darmes. Auch in einer radiologischen Abdomenübersichtsaufnahme finden sich nur unspezifische Zeichen; sie dient vor allem dem Ausschluss anderer Ursachen der Beschwerden. Gelegentlich kann hierbei eine Verdickung der Darmwand festgestellt werden. Die Methoden der Wahl zur Diagnosestellung sind eine Computertomographie (CT), insbesondere in Kombination mit einer CT-Angiographie oder eine Katheterangiographie der Mesenterialgefäße [Oldenburg et al., 2004]. Bei der Katheterangiographie kann direkt nach der Diagnostik therapeutisch eine Embolektomie oder Dilatation der verschlossenen Arterie angeschlossen werden. Auch eine medikamentöse Lyse des Thrombus oder Embolus kann in Erwägung gezogen werden. Ist eine interventionelle radiologische Therapie nicht möglich oder besteht der Verdacht auf eine Nekrose des betroffenen Darmabschnittes muss eine explorative Laparotomie durchgeführt werden, die verschlossene Arterie embolektomiert, endarteriektomiert oder per Bypass wiedereröffnet und/oder der geschädigte Darm entfernt werden [Yeo et al., 2007]. Gleichzeitig müssen die Patienten intensivmedizinisch betreut werden: eine adäquate Volumentherapie des meist hypovolämen Patienten ist essenziell, eine kalkulierte antibiotische Therapie sollte bei Verdacht auf Durchwanderung des Darmes mit Bakterien begonnen werden. Außerdem erforderlich sind eine suffiziente Analgesie sowie die Antikoagulation z.B. mit Heparin bei fehlenden Kontraindikationen [Oldenburg et al., 2004; Yeo et al., 2007]. Heparin selbst kann dosisabhängig in (sub)therapeutischen Konzentrationen die hämodynamische Situation von Ratten bei mesenterialer I/R verbessern und in geringerem Maß den Darm vor mesenterialem I/R-Schaden schützen [Walensi et al., 2013].

1.1.6 Pathomechanismen der Ischämie und Reperfusion

Bei der Entstehung und den Auswirkungen von mesenterialem I/R-Schaden handelt es sich um sehr komplexe pathophysiologische Vorgänge, die netzartig intra- und extrazellulär eine Vielzahl von Radikalen, Botenstoffen und verschiedenste Zellen involvieren [de Groot und Rauen, 2007]. In der Ischämie kann es schon innerhalb weniger Minuten durch Sauerstoffmangel infolge des unterbrochenen Blutflusses zur Schädigung von vitalem Darmgewebe – insbesondere der äußerst empfindlichen Villi – kommen, da Enterozyten ihren Energiebedarf nur sehr eingeschränkt über die anaerobe Glykolyse decken können [de Groot, 2005]. Dieser ischämische Schaden kann jedoch durch den in der Reperfusion entstehenden Schaden noch übertroffen werden [Mallick et al., 2004].

Die Darmmukosa ist besonders reich an Xanthin-Dehydrogenase, einem Enzym das unter physiologischen Bedingungen beim Adenosintriphosphat/Purinabbau entstehendes Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure oxidiert [Mallick et al., 2004]. Unter Sauerstoffmangelversorgung wird vermehrt Xanthin-Dehydrogenase zu Xanthin-Oxidase konvertiert, welche reaktive Sauerstoffspezies erzeugen kann. Die unter Hypoxie auftretende verminderte mitochondriale Energieproduktion (durch geringere oxidative Phosphorylierung) resultiert in einem Mangel an Adenosintriphosphat (ATP). Dies wiederum beeinflusst ATP-abhängige Membrantransporter wie z.B. Ionenkanäle; es kommt zum Ausstrom von Kalium (K^+) und Magnesium nach extrazellulär, sowie zum Einstrom von Natrium (Na^+) und sekundär Kalzium (Ca^{2+}) sowie Wasser (H_2O) nach intrazellulär. Die zelluläre Eisenhomöostase wird beeinträchtigt, außerdem sinkt der zytosolische pH-Wert durch den Abbau von ATP, durch die verstärkte ATP-Produktion durch die (nun notwendige) anaerobe Glykolyse sowie durch Freisetzung von H^+ -Ionen aus zerstörten Lysosomen [de Groot, 2005; de Groot und Rauen, 2007; Toledo-Pereyra et al., 2004]. Diese Vorgänge können eine zelluläre Schwellung und Nekrose verursachen. Intrazellulär erhöhtes Ca^{2+} aktiviert Phospholipasen, Proteasen, ATPasen und Endonukleasen, so dass Membranen und Proteine des Zytoskeletts zerstört werden und Veränderungen im Chromatin des Nukleus auftreten. Die Permeabilität der Zellmembran wird erhöht. Die intrazellulär erhöhte Ca^{2+} -Konzentration stimuliert ebenfalls die Konversion der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase. Extrazellulär kommt es neben der Anhäufung von K^+ auch zu einer Akkumulation von anderen Metaboliten wie Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Adenosin, welche wiederum zu Vasodilatation und Hyperämie führen können [Oldenburg et al., 2004; Toledo-Pereyra et al., 2004].

Werden während der Reperfusion die Zellen wieder mit molekularem Sauerstoff versorgt, kommt es zu einer stark vermehrten Bildung von ROS durch mehrere Mechanismen, u.a. durch die Reaktion der Xanthin-Oxidase mit dem angereicherten Hypoxanthin [Mallick et

al., 2004] oder durch die chemische Oxidation reduzierter Zellbestandteile. Am meisten ROS entstehen aber wohl durch die Schädigung der mitochondrialen Atmungskette [de Groot, 2005]. So kann es in der Reperfusion bei den noch vitalen Zellen durch geschädigte Enzyme zu einem Elektronentransfer auf Sauerstoff (O_2) kommen [de Groot und Rauen, 2007]. Es entstehen reaktive Spezies wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$; Ein-Elektronen-Reduktion) und auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2 ; Zwei-Elektronen-Reduktion; [de Groot, 2005]), u.a. auch durch den $O_2^{\cdot-}$ -Abbau durch die Superoxiddismutase (SOD; [Mallick *et al.*, 2004]. Freie Radikale, die u.a. einige ROS einschließen, haben ein einzelnes ungepaartes Valenzelektron, so dass sie meist extrem reaktiv und instabil sind und mit vielen zellulären Strukturen reagieren können [Cerqueira *et al.*, 2005]. Das Superoxidanion und auch Wasserstoffperoxid sind weniger reaktive Moleküle, sie können jedoch die Bildung weiterer Radikale induzieren, z.B. in Anwesenheit von Eisenionen die des sehr reaktiven Hydroxylradikals (OH^{\cdot} ; Kapitel 1.2; [de Groot, 2005]). OH^{\cdot} kann erheblichen Schaden beispielsweise an Zellmembranen verursachen, indem es den Vorgang der Lipidperoxidation initiiert (Kapitel 2.3.2.3.3 und 4.2.1.1). Unter anderem kann es dadurch wiederum zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran kommen. Die Rolle von ROS bei der mesenterialen I/R-Schädigung wird deutlich durch die Reduktion des Gewebeschadens vermittelt durch Antioxidantien, wie z.B. Xanthin-Oxidase-Inhibitoren oder Radikalfängern (Kapitel 1.2, 1.3 und 1.5; [Oldenburg *et al.*, 2004]).

Infolge der Ischämie und Reperfusion können außerdem verschiedene Endotheline, Hitzeschockproteine, Prostaglandine, Leukotriene und Stickstoffmonoxid entstehen und ihrerseits verschiedenste Signalkaskaden induzieren, die zum Zelltod führen [Cerqueira *et al.*, 2005; Oldenburg *et al.*, 2004].

Auch den einwandernden neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) als Untergruppe der Leukozyten wird ein großer Schädigungsfaktor bei I/R zugeschrieben [Cerqueira *et al.*, 2005; Toledo-Pereyra *et al.*, 2004]. Neutrophile adhären vermehrt an den Endothelzellen kleiner Venen des geschädigten Darmes und migrieren rezeptorvermittelt durch das Endothel. Der Vorgang der Emigration aus dem Gefäßsystem in die Darmwand wird in „Rolling“, Adhäsion und Diapedese unterteilt. Dabei werden die verschiedenen Stadien durch verschiedene Proteine gesteuert, u.a. Selektine, Integrine, Leukotriene, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) und VCAM-1 (Vascular Cellular Adhesion Molecule). Die vermehrte Expression einiger dieser Proteine wird durch die mesenteriale I/R induziert [Cerqueira *et al.*, 2005; Toledo-Pereyra *et al.*, 2004]. Die Neutrophilen können das Darmgewebe durch verschiedene Mechanismen schädigen: Durch Freisetzung von Elastase aus deren zytoplasmatischen Granula, durch den sogenannten „respiratory burst“ bei dem ROS produziert und freigesetzt werden und auch durch

Verstopfen der kleinen Gefäße des Darmes und den dadurch resultierenden verminderten Blutfluss, der den Ischämieschaden weiter vorantreibt [Mallick *et al.*, 2004]. Des weiteren kann es durch Schädigung von Mukosa und Submukosa durch aktivierte Neutrophile über Erhöhung der vaskulären Permeabilität zur Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen in das Blutgefäßsystem kommen [Cerqueira *et al.*, 2005]. Romson *et al.* konnten 1983 zeigen, dass eine Verringerung der Neutrophilenanzahl im Körper durch den Einsatz eines Neutrophilenantiserum nachweislich die Infarktgröße am Myokard von Hunden in ähnlicher Weise reduziert wie die enzymatischen Antioxidantien SOD und Katalase [Romson *et al.*, 1983]. Auch bei der mesenterialen Ischämie in experimentellen Studien an Katzen und Ratten ist eine geringere Schädigung durch Verringerung der Neutrophilenakkumulation gezeigt worden ([Grisham *et al.*, 1986; Hernandez *et al.*, 1987; Sekizuka *et al.*, 1989; Zimmerman *et al.*, 1990]; Kapitel 4.2.2.1).

Daneben ist auch das Plättchensystem beim mesenterialen I/R-Schaden involviert. Thrombozyten können entzündungsfördernde Substanzen wie Thromboxan A₂, Leukotriene, Serotonin, Plättchenfaktor 4 und Platelet Derived Growth Factor freisetzen. Auch hierüber kann die Leukozytenfunktion moduliert werden [Cerqueira *et al.*, 2005]. Die Plättchen können an Gefäßwänden adhären, zellulär interagieren und weitere Signalkaskaden oder wiederum die Freisetzung von ROS initiieren. Auch kann im Rahmen der Reperfusion die durch Thrombozyten bedingte Gerinnung beeinträchtigt sein [Aydemir-Koksoy, 1999]. So kann einerseits die Anzahl der Thrombozyten durch Adhäsion an die Gefäßwände deutlich sinken, andererseits können die Thrombozyten auch in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. Die Ursache für eine verminderte Aggregation kann an einer geringeren Sensitivität für Triggermediatoren wie ADP oder Kollagen liegen. Eine verlängerte Blutungszeit kann die Folge sein [Aydemir-Koksoy, 1999].

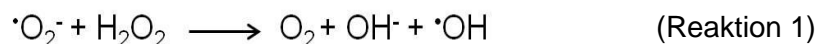
Ferner spielt auch das Komplementsystem eine Rolle beim I/R-Schaden des Darmes. Entzündungsfördernde Substanzen werden durch die Aktivierung des Komplementsystems durch Freisetzung von Stoffwechselprodukten aus dem Darmlumen produziert; beispielsweise wird über C5 die vermehrte Expression von ICAM-1 stimuliert und es kommt zur Hochregulation von proinflammatorischen Cytokinen wie Tumornekrosefaktor α und Interleukin-1 α [Cerqueira *et al.*, 2005].

Letztlich kommt es auch zu einer mikrovaskulären Perfusionsstörung, u.a. durch eine Schwellung der Endothelzellen durch die I/R-Schädigungsprozesse und konsekutiv zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems, durch Verstopfen der Kapillaren durch Leukozyten (s.o.) und durch Hämokonzentration und Thrombusbildung [de Groot, 2005].

1.2 Eisenchelatoren

Chelatkomplexe bestehen aus zwei- oder mehrzähligen Liganden, welche mindestens zwei Koordinationsstellen eines Zentralatoms einnehmen [Aktories *et al.*, 2005; Pschyrembel und Dornblüth, 2004]. Das geschieht über eine koordinative Bindung, bei der die Bindungselektronen allein vom Liganden gestellt werden. Als Zentralatom findet sich meist ein positiv geladenes Metallion, oft ein zwei- oder dreiwertiges Eisenion [Pschyrembel und Dornblüth, 2004]. Beispiele für Chelatkomplexe bzw. Komplexbildner sind das Häm (mit Porphyrin als Ligand und einem Eisenion als Zentralatom) im Hämoglobin, EDTA (Etylendiamintetraacetat), welches Kalzium als Zentralatom hat und zur Gerinnungshemmung bei Blutabnahmen eingesetzt wird, sowie Dimercaptopropansulfonsäure als wichtigstes Antidot bei Metallvergiftungen [Aktories *et al.*, 2005]. Durch die Chelatisierung von Eisenionen kann die Entstehung des reaktiven Hydroxylradikals (im Rahmen der Fenton-Haber-Weiss-Reaktion) verhindert werden [Gutteridge *et al.*, 1979; Kehrer, 2000]. Als labiles oder chelatisierbares, redoxaktives Eisen werden diejenigen Eisenionen bezeichnet, die lose an Zellbausteine wie ADP, Proteine oder Phospholipide gebunden sind [de Groot, 2005].

Die ursprünglich von F. Haber aufgestellte Netto-Reaktion:



benötigt ein metallisches Ion als Katalysator, sodass zusammen mit der Fenton-Reaktion die Fenton-Haber-Weiss-Gleichung entsteht ([Kehrer, 2000]; Abbildung 4).

Fenton-Haber-Weiss-Reaktion:

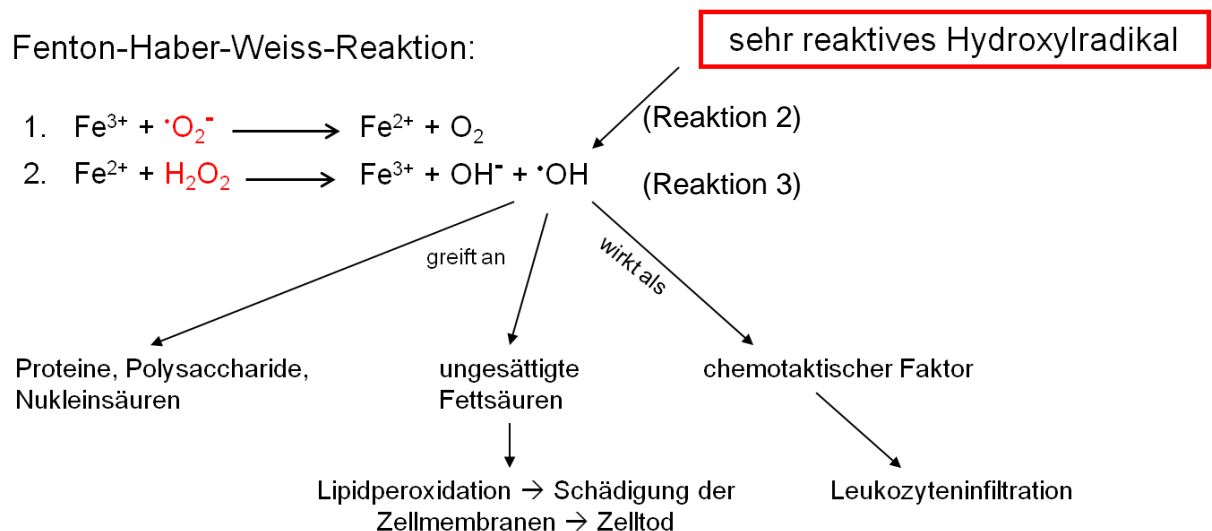
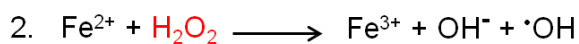
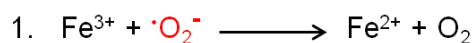


Abbildung 4: Darstellung der Reaktionsschritte der eisenabhängigen Fenton-Haber-Weiss-Reaktion und der durch das entstehende Hydroxylradikal verursachten Folgereaktionen (modifiziert nach [Löffler und Petrides, 2003]).

Im ersten Schritt wird dabei ein Fe^{3+} -Ion während der Reaktion mit einem Superoxidanion (O_2^-) zu einem Fe^{2+} -Ion reduziert (Reaktion 2). Im zweiten Schritt entsteht das Hydroxylradikal bei der Oxidation des Fe^{2+} -Ions durch Wasserstoffperoxid. Dabei entstehen wieder ein Fe^{3+} -Ion und ein Hydroxidion (OH^- ; Reaktion 3). Für die Aktivatorfunktion des Eisens ist sein Reduktionszustand entscheidend: nur Fe^{2+} kann die Bildung des Hydroxylradikals katalysieren. Es wird davon ausgegangen, dass sich die zellulären Redoxsysteme durch die Hypoxie der ischämischen Phase v.a. im reduzierten Zustand befinden, weswegen in der Reperfusion der Großteil der Eisenionen in seiner reduzierten Fe^{2+} vorliegen sollte [de Groot, 2005].

Das Hydroxylradikal schädigt DNA oxidativ [Kehrer, 2000], wobei die Base Guanin besonders empfindlich ist. Neben Strangbrüchen und Fehlpaarungen können auch genetische Mutationen entstehen [Löffler und Petrides, 2003]. Der Effekt des Hydroxylradikals auf Proteine betrifft vor allem die besonders empfindlichen Methionin-, Histidin- und Tryptophanreste; auch die Thiolgruppe des Cysteins wird modifiziert. So entstehen Veränderungen im aktiven Zentrum der Proteine oder andere Raumstrukturen der Proteine, die mit einer veränderten biologischen Aktivität oder Funktionsverlust einhergehen [Löffler und Petrides, 2003].

Vor allem Lipide haben eine entscheidende Funktion im Aufbau der Zellmembran. Jegliche Art von Störung kann zum Funktionsverlust der Zellmembran und somit zum Zelltod führen. Insbesondere die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind Angriffspunkt für Radikale wie das Superoxidradikal oder das Hydroxylradikal [Kehrer, 2000; White et al., 1985]. Im Verlauf einer Lipidperoxidation genannten Kettenreaktion (Kapitel 2.3.2.3.3 und 4.2.1.1) kommt es über die Bildung von Alkyl- und Alkoxyradikalen zu immer größerem Schaden bis hin zu einem nekrotischen Zelluntergang. Vorher kann es zu Störungen in der Signaltransduktion oder zu Veränderungen in der Funktionalität von Ionenkanälen kommen; die Lipidmembran kann permeabler für eine Vielzahl von Ionen und größere Moleküle werden. Schließlich verlieren die einzelnen Zellen ihre Integrität und Funktion [Kehrer, 2000; Löffler und Petrides, 2003]. In einem Rattenmodell erzeugte die Okklusion der *A. mesenterica superior* für 90 Minuten und 150 Minuten Reperfusion sehr hohe Gewebekonzentrationen Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS), deren Entstehung als Maß für die Lipidperoxidation gilt ([Lutz et al., 1990], Kapitel 2.3.2.3.3).

Der bekannteste klinisch und auch experimentell eingesetzte Eisenchelator ist Deferoxamin (oder auch Desferrioxamin, Desferal®). Aus dem aus *Streptomyces pilosus* gewonnenen Ferrioxamin kann durch chemisches Entfernen des trivalenten Eisens das eigentliche Desferrioxamin gewonnen werden [Keberle, 1964]. Es ist eine

höhermolekulare Verbindung (Summenformel $C_{25}N_6H_{48}O_8$; Molekulargewicht 560,684 g/mol [Keberle, 1964]) mit drei Hydroxamsäureresten, die ihren basischen Charakter durch eine freie Aminogruppe erhält. So ist Deferoxamin in der Lage, Salze mit organischen und anorganischen Säuren zu formen [Keberle, 1964; Löffler und Petrides, 2003]. Deferoxamin besitzt vor allem zu Fe^{3+} -Ionen eine hohe Affinität. Der menschliche Körper scheidet Eisen nicht aktiv aus und verliert täglich auch nur kleine Mengen des Metalls [Aktories et al., 2005]. Normalerweise wird nur so viel Eisen vom Körper resorbiert, wie zur Kompensation des Verlustes erforderlich ist. Deferoxamin wird klinisch bei krankhafter Eisenüberladung (z.B. bei Hämochromatose oder sideroblastischer Anämie) angewendet, da es durch Chelatisierung von Eisenionen eine renale Exkretion von Eisen ermöglicht. Mittlerweile liegen sowohl oral als auch parenteral verabreichbare Modifikationen des Deferoxamins vor [Aktories et al., 2005].

Da ROS eine große Rolle bei Schädigungen diverser Organe durch I/R spielen (Kapitel 1.1.6), sollte auch ein Eisenchelator, der die weitere Entstehung von ROS über die Fenton-Haber-Weiss-Reaktion verhindern kann, den I/R-Schaden begrenzen können. Deferoxamin wurde daher bereits in einigen Studien zur Ischämie/Reperfusion verschiedener Organe eingesetzt. Aus diesen Versuchen ging unter anderem hervor, dass das Hydroxylradikal eine Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems mit Freisetzung des chemotaktischen Faktors C5a spielt und so die Leukozytenaggregation fördert [Turnage et al., 1994]. Dabei verhinderte die Vorbehandlung von Ratten mit 15 mg/kg i.v. Deferoxamin oder 1 mg/kg i.v. Dimethylthiourea (als Hydroxylradikalfänger) eine gesteigerte Plasma-Komplement-Aktivität und somit eine Chemotaxis von Neutrophilen nach 120 Minuten intestinaler Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. In einem weiteren Rattenmodell zur Ischämie und Reperfusion des Dünndarmes durch 90-minütiges Abklemmen der A. mesenterica superior verlängerte die einmalige i.v.-Gabe von 15 mg/kg Deferoxamin das Überleben der Ratten (Endpunkt nach 24 Stunden) signifikant und verringerte die histologische Schädigung des Darmes deutlich [Lelli et al., 1993]. Deferoxamin wurde zudem bereits in dem am Institut für Physiologische Chemie (Universitätsklinikum Essen) etablierten Rattenmodell zur mesenterialen Ischämie (90 Minuten Ischämie/ 120 Minuten Reperfusion) getestet [Petrat et al., 2010]. Nach intravenöser Infusion von 10 mg/kg wurde der Dünndarm vor allem im proximalen und mittleren Jejunum vor einer Einblutung in das Gewebe geschützt. Auch der Makroscore als Parameter für die Einblutung in den Dünndarm (Kapitel 2.3.2.3.1) lag signifikant unter dem der Kontrollgruppe.

1.3 Katalase

Durch viele intrazelluläre Enzyme, wie z.B. die NADPH-Oxidoreduktase oder die Xanthin-Oxidase, entstehen in Nebenreaktionen von enzymatischen Umsetzungen relevante Mengen an Superoxidanionen, welche durch die SOD rasch zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abgebaut werden [Löffler und Petrides, 2003]. H_2O_2 kann über verschiedene Wege abgebaut werden, eine Möglichkeit ist der Abbau über die Glutathionperoxidase. Der Hauptabbau findet jedoch über das Enzym Katalase statt.

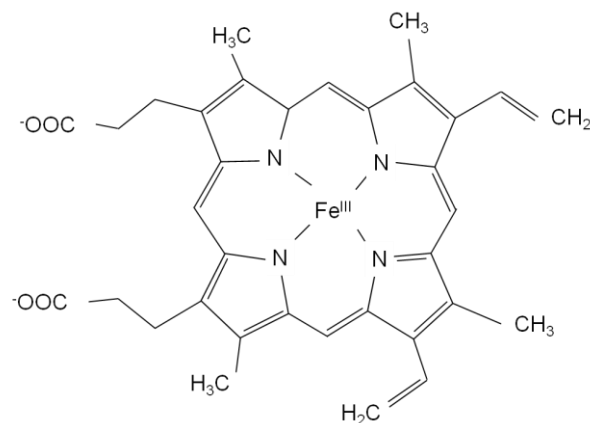
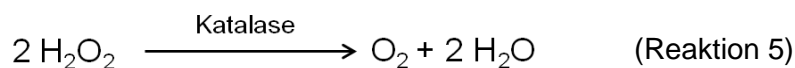
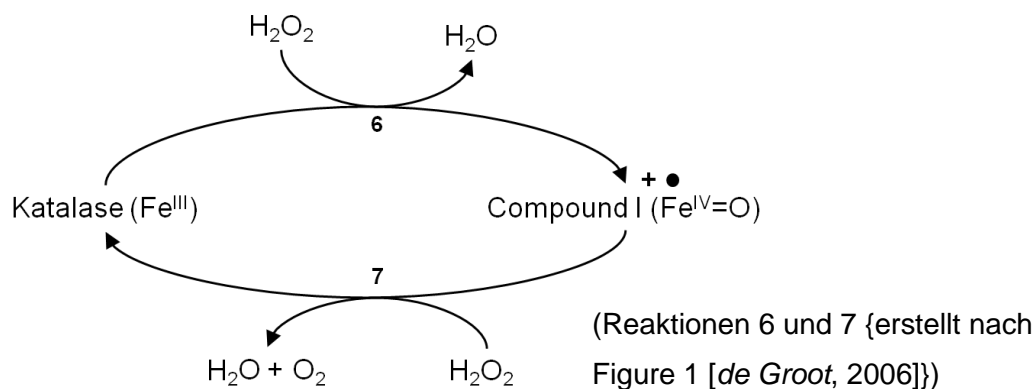


Abbildung 5: Darstellung der Strukturformel des Fe(III)-Protoporphyrin-IX-Komplexes der Häm-Gruppen der Katalase (modifiziert nach [Löffler und Petrides, 2003]).

Katalase ist eine Oxidoreduktase, die aus vier identischen Untereinheiten mit jeweils einer Häm-Gruppe (Fe(III)-Protoporphyrin-IX-Komplex) besteht ([Löffler und Petrides, 2003; Pschyrembel und Dornblüth, 2004]; Abbildung 5). Katalase disproportioniert Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff [O_2 ; Stöchiometrie 2:1 ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_2$); Reaktion 5]. Katalase bindet an zwei Moleküle H_2O_2 gleichzeitig, wobei das eine Molekül H_2O_2 als Elektronenakzeptor, das andere als Elektronendonator fungiert [Löffler und Petrides, 2003]. Die Reaktion läuft in zwei Reaktionsschritten ab [Autzen et al., 2001]. Zuerst interagiert ein Molekül H_2O_2 mit dem Eisen(III)-Zentrum des Porphyrins und bildet einen Ferryleisenkomplex ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), sodass ein Porphyrin-Radikal-Kation entsteht (Compound I; Reaktion 6). Im zweiten Schritt reagiert Compound I mit dem zweiten H_2O_2 -Molekül und Eisen(III)-Porphyrin wird regeneriert ([Autzen et al., 2001]; Reaktion 7).





Katalase entgiftet somit reaktives H₂O₂ und wird daher zu den enzymatischen Antioxidantien gezählt. Katalase besitzt eine hohe katalytische Effizienz und eine der höchsten Wechselzahlen aller Enzyme ($k_{\text{cat}} = 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Paschke et al., 2001]. Im menschlichen Körper befindet es sich vor allem in Peroxisomen und Erythrozyten [Pschyrembel und Dornblüth, 2004].

Durch den Abbau von H₂O₂ kann Katalase somit die Entstehung von Hydroxylradikalen und weiteren ROS im Rahmen der Lipidperoxidation verhindern (Kapitel 1.1.6). Auch in Versuchen zu I/R von Organen hat sich der Einsatz von Katalase als protektiv erwiesen. Einige Autoren konnten den Benefit des Einsatzes von Katalase allein, eines Katalasemimetikums [Rauen et al., 2004b] oder protektive Effekte der Kombination von Katalase und SOD zeigen; verschiedene Organe, z.B. Niere [Gianello et al., 1996], Herz [Jolly et al., 1984] und Endothel [Kvietys et al., 1989] wurden vor durch ROS-vermitteltem I/R-Schaden geschützt. Bei kombinierter Gabe von Katalase und SOD waren allerdings die positiven Effekte nicht eindeutig einem der beiden Enzyme zuzuordnen [Kvietys et al., 1989].

1.4 TAA-1

Das Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. R. Sustmann) entwickelte in Kooperation mit dem Institut für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen das Tetraazaannulen-Derivat TAA-1 (di(2,2-dimethyl[1,3]dioxolo)benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraaza-cyclotetradeca-2,4,6,9,11-hexaen), dessen Eisen(III)-Komplex TAA-1/Fe eine hohe katalasemimetische, also H₂O₂-abbauende, Aktivität aufweist ([Paschke et al., 2001]; Abbildung 6). Der Unterschied zu bisher entwickelten Katalasemimetika liegt darin, dass diese nahezu ausschließlich aus porphyrinähnlichen Systemen bestehen und als zentrales Metallion Mangan enthalten [Gianello et al., 1996]. Es konnte in zellfreien Systemen gezeigt werden, dass das

Katalasemimetikum TAA-1/Fe bei einem physiologischem pH-Wert H_2O_2 mit einer der nativen Katalase ähnlichen Stöchiometrie von 2:1 ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_2$) zu Sauerstoff und Wasser degradiert [Paschke et al., 2001; Rauen et al., 2004b].

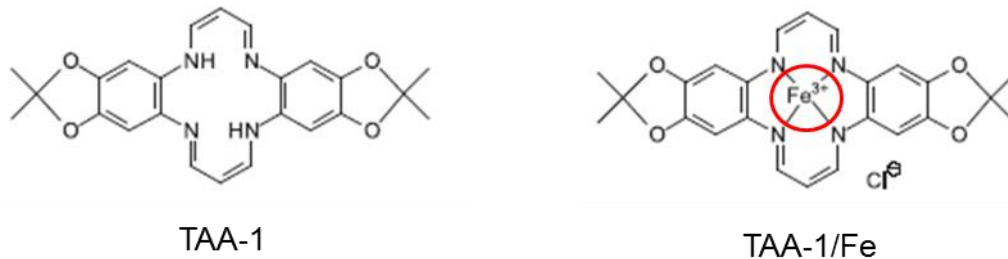


Abbildung 6: Strukturformeln des Vorläufers TAA-1 ohne Eisenion und des Katalasemimetikums TAA-1/Fe mit gebundenem Fe^{3+} -Ion im Zentrum (nach [Rauen et al., 2004b]).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Vorläufer des Katalasemimetikums, der eisenfreie Ligand (oder Prodrug) TAA-1, intrazellulär Eisenionen chelatisieren kann und sich hierdurch der aktive Katalasemimetikumkomplex TAA-1/Fe bildet [Rauen et al., 2004b]. TAA-1 könnte also auf zweifachem Wege vor eisenabhängigen, oxidativen Zellschädigungsprozessen schützen: zunächst über die Chelatisierung redoxaktiver Eisenionen (TAA-1) und anschließend als H_2O_2 -abbauendes Katalasemimetikum (TAA-1/Fe; Abbildung 7). Dass diese theoretische Überlegung in zellulären Systemen tatsächlich in dieser Form abläuft, wurde 2009 an isolierten Hepatozyten belegt [Rauen et al., 2009].

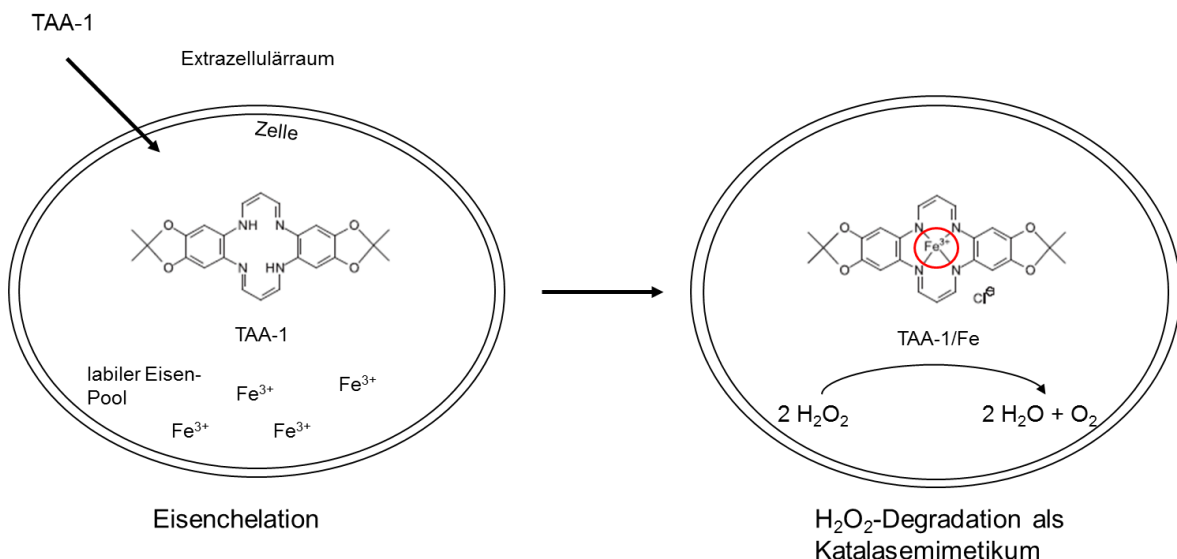


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus des Liganden TAA-1 zunächst extrazellulär im Blut oder Zellüberstand, dann als intrazellulärer Eisenchelator und schließlich als aktives Katalasemimetikum TAA-1/Fe (Strukturformel TAA-1/(Fe) modifiziert nach [Rauen et al., 2009]).

Im Jahr 2004 wurden das Prodrug TAA-1 und das Katalasemimetikum TAA-1/Fe erstmals in biologischen Systemen eingesetzt [Rauen et al., 2004b]. Es fanden umfangreiche Untersuchungen zur experimentell induzierten Eisen- und H_2O_2 -Toxizität an zwei verschiedenen Zelllinien statt. Weder TAA-1 noch TAA-1/Fe waren bei Inkubation der Zellen mit 30 μM TAA-1/Fe bzw. 6 μM TAA-1 über 48 Stunden toxisch, während bezüglich der H_2O_2 - und eiseninduzierten Zellschädigung bereits eine niedrige Konzentration (6 μM) der jeweiligen Substanz protektiv war. Im Vergleich zu TAA-1/Fe war TAA-1 in dem durch redoxaktive Eisenionen induzierten Schädigungsmodell deutlich protektiver, was auf dessen intrazelluläre Funktionalität als Chelatbildner hinweist [Rauen et al., 2004b].

In einer anderen Arbeit wurde TAA-1/Fe im Hinblick auf die eiseninduzierte Schädigung in Hepatozyten untersucht [Rauen et al., 2004a]. TAA-1/Fe hatte auch hier eine protektive Wirkung, obwohl in diesem Modell eine eher geringe intrazelluläre Konzentration an H_2O_2 anzunehmen war (aufgrund der hohen Katalaseaktivität im Hepatozyten). Daraus wurde geschlussfolgert, dass auch geringe Mengen H_2O_2 erheblich zur eiseninduzierten Schädigung beitragen könnten. Am selben Zellmodell wurde auch extrazelluläre native Katalase getestet, welche aber im Vergleich zu dem membranpermeablen Katalasemimetikum TAA-1/Fe keinen Benefit erzielte. TAA-1/Fe könnte somit ein deutlich potenteres Antioxidans als hinzugefügte native Katalase sein [Rauen et al., 2004a].

TAA-1 wurde in allen oben beschriebenen Versuchen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, für das zahlreiche biologische Effekte bekannt sind.

1.5 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein bekanntes organisches Lösungsmittel. Es ist dipolar und hygroskopisch ([David, 1972]; Abbildung 8). Es handelt sich um eine farblose bis leicht gelbliche Flüssigkeit mit einem Gefrierpunkt bei 18,5°C [Brayton, 1986]. Die hohe Wasserbindungskapazität erhält DMSO durch seine Nukleophilie, da es freie Elektronenpaare an seinen Schwefel- und Sauerstoffatomen besitzt. DMSO kann somit als Lösungsmittel oder auch als Reagenz fungieren da es prinzipiell sowohl als Elektronenakzeptor wie auch als –donor agieren kann. [David, 1972]. In der Regel dient DMSO jedoch als Akzeptor für Protonen und kann so als Lewis-Base reagieren [Brayton, 1986].

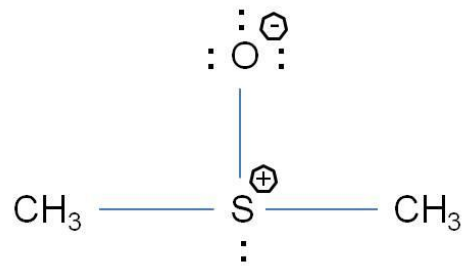


Abbildung 8: Struktur und Polarisierung von Dimethylsulfoxid (DMSO; nach [David, 1972]).

DMSO ist sehr gut mischbar mit Wasser und organischen Substanzen wie Glycerin, Proteinen, Nukleinsäuren oder Polysacchariden. Die bei der Mischung mit Wasser stattfindende Reaktion läuft exotherm ab [Brayton, 1986; David, 1972].

Seit den 1960er Jahren wurden umfangreiche Studien mit DMSO sowohl an Tieren als auch an Menschen durchgeführt. Es wurden u. a. folgende Erkenntnisse gewonnen:

DMSO penetriert intakte Haut leicht, schnell und vollständig ohne dabei irreversiblen Schaden anzurichten [David, 1972]. Auch Mukosa, die Blut-Hirn-Schranke sowie Zellen und Zellorganellen werden rasch durchdrungen [Brayton, 1986]. Außerdem kann DMSO als Vehikel für andere, unter Umständen schwerlösliche, Substanzen dienen [Brayton, 1986; Capriotti und Capriotti, 2012; Jacob und Herschler, 1986].

DMSO verteilt sich nach dermalen, oraler oder intraperitonealer Applikation in den Organen innerhalb von 30 bis 120 Minuten [Hucker et al., 1966]. Es wird zum Teil metabolisiert, einerseits zu Dimethylsulfid (DMS) und zu Dimethylsulfon (DMSO₂). Charakteristisch für DMSO ist der knoblauchartige Mundgeruch, der auch nach dermalen Applikation häufig auftritt [David, 1972; Hucker et al., 1966].

Die Langzeittoxizität von DMSO wurde vielfach für verschiedene Applikationsformen untersucht. Selbst eine längerfristige dermale Applikation verursachte allenfalls leichte Hautveränderungen [Smith et al., 1967]. Orale, dermale, intravenöse und intraperitoneale Applikationen von verschiedenen DMSO-Konzentrationen zeigten selten gravierende Schädigungen, darunter jedoch beispielsweise Apnoe und Hypotension bei Bolusgabe, hämolytische Anämien mit Hämoglobinurie ([DiStefano und Klahn, 1965]; Kapitel 4.2.2.2) sowie Gewichtsverlust, Tubulonephritis, und diffuse Nekrosen an der Injektionsstelle und Leber, Pankreas und Milz nach intraperitonealer Applikation [Caujolle et al., 1967].

Zu weiteren Nebenwirkungen von DMSO zählen u.a. gravierende Hämolyse [Samoszuk et al., 1983] und Hautreaktionen wie z.B. Hautrötung oder Urtikaria [Brayton, 1986].

Die mittlere letale Dosis (LD-50) für die intravenöse Applikation von DMSO bei Ratten, Mäuse, Katzen und Hunden liegt zwischen 2,5 und 8,9 g/kg KG [Smith et al., 1967].

DMSO wurde zur Schmerzlinderung z.B. beim Chronic Regional Pain Syndrome [Geertzen *et al.*, 1994] eingesetzt und soll sowohl antiinflammatorisch, analgetisch, bakteriostatisch wie auch vasodilatatorisch wirken [Jacob und Herschler, 1986]. Ebenfalls beschrieben wurden Muskelrelaxation und Effekte auf die Plättchenaggregation ([Jacob und Herschler, 1986]; Kapitel 4.2.2.1).

Neben seiner Zulassung durch die Food and Drug Administration zur Therapie der interstitiellen Cystitis 1987 wurde DMSO bei einer Vielzahl von Erkrankungen erfolgreich eingesetzt, darunter als Arzneimittel für Amyloidose, beim traumatischen Hirnödem oder bei rheumatoider Arthritis [Santos *et al.*, 2003] sowie topisch bei Hauterkrankungen wie beispielsweise Ulzerationen bei Dekubitus oder muskuloskeletalen Verletzungen bei Pferden [Capriotti und Capriotti, 2012]. Auch bei Krankheiten des Gastrointestinaltraktes wurde DMSO erfolgreich appliziert, beispielsweise bei stressinduzierter Gastritis [Salim, 1991]. Des weiteren ist DMSO ein bekanntes und häufig eingesetztes Mittel zur Kryokonservierung von Zellen und Zellkulturen [Ashwood-Smith, 1975].

DMSO wird in vielen Veröffentlichungen als Hydroxylradikalfänger beschrieben [Ashwood-Smith, 1975; Salim, 1991] und könnte in dieser Funktion in einer ähnlichen Form wie Eisenchelatoren im Rahmen der Fenton-Haber-Weiss-Reaktion (Kapitel 1.2) die weitere Entstehung von schädlichen Sauerstoffspezies verhindern. Es konnte für DMSO eine protektive Wirkung bei verschiedenen Formen der Gewebeischämie nachgewiesen werden, u.a. am ischämischen Herzen bei hypothermer Konservierung vor Transplantation [Shlafer *et al.*, 1982], am Gehirn [Shimizu *et al.*, 1997], an Niere [Kedar *et al.*, 1983] und Leber [Sahin *et al.*, 2004]. Es existieren jedoch nur uneinheitliche Daten zur Protektion von DMSO bei mesenterialer Ischämie/Reperfusion. Einige Autoren haben positive Effekte beschrieben, z.B. eine Reduktion der peritonealen Entzündungsreaktion sowie ein vermindertes Auftreten von Adhäsionen, Ileus oder Nekrosen der Darmwand [Demetriou *et al.*, 1985], geringere Ödeme [Dabareiner *et al.*, 2005] oder verminderte Leukozyteninfiltration [Sekizuka *et al.*, 1989] und ein verringertes Kapillarleck [Parks *et al.*, 1984]). Einige Studien konnten jedoch keinerlei Effekt nachweisen [Mirkovitch und Winistörfer, 1987; Zimmerman *et al.*, 1990].

1.6 Problemstellung

Die mesenteriale Ischämie ist ein nach wie vor höchst relevantes Krankheitsbild. Nicht nur im Rahmen der Herzchirurgie [Bolcal *et al.*, 2005], sondern auch in der Intensivmedizin [Leone *et al.*, 2015] tritt die mesenteriale Ischämie regelmäßig auf, mit einer Mortalität von bis zu 100% ([Cudnik *et al.*, 2013]; Kapitel 1.1). Noch immer stehen chirurgische oder interventionelle Verfahren zur Resektion des Darmes oder zur Rekanalisation der verschlossenen Gefäße im Vordergrund der Therapie [Yeo *et al.*, 2007]. Substanzen zu finden oder zu entwickeln, die den mesenterialen Ischämie/Reperfusionsschaden abschwächen, ist Gegenstand vieler Untersuchungen.

Eine mögliche Pathogenese der Schädigung beinhaltet die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder dem Hydroxylradikal, wobei dessen Entstehung durch Eisenionen über die Fenton-Haber-Weiss-Reaktion gefördert werden kann ([Cerqueira *et al.*, 2005; Oldenburg *et al.*, 2004]; Kapitel 1.1.6, 1.2 und 1.3).

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. R. Sustmann) und dem Institut für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen wurde das Prodrug TAA-1 (ein Tetraazaannulen-Derivat, [Paschke *et al.*, 2001]; Kapitel 1.4)) entwickelt, welches in der Lage ist, Zellmembranen zu penetrieren, als Eisenchelator in seinem aktiven Zentrum dreiwertige Eisenionen zu binden und so das aktive Katalasemimetikum TAA-1/Fe zu bilden und H_2O_2 abzubauen. Als Lösungsmittel für das hydrophobe TAA-1 wurde DMSO verwandt. Bisher wurde TAA-1/DMSO sowie TAA-1/Fe/DMSO nur in Zellkultursystemen getestet, mit eindrucklichen, protektiven Effekten [Rauen *et al.*, 2004a; Rauen *et al.*, 2004b]: Es schützte u.a. vor Eisen- und H_2O_2 -induzierter Zellschädigung während toxische Wirkungen nicht nachgewiesen werden konnten. Eine Anwendung von TAA-1/DMSO *in vivo* fand bisher jedoch noch nicht statt.

Da auch über das Lösungsmittel DMSO seit den 1960er Jahren Schutzeffekte in Versuchen zur Ischämie/Reperfusion (z.B. als Hydroxylradikalfänger [Ashwood-Smith, 1975] oder durch Protektion vor Ödembildung [Dabareiner *et al.*, 2005] oder Nekrosen der Darmwand [Demetriou *et al.*, 1985]; Kapitel 1.5) publiziert wurden, lässt sich ein dreifacher Schutzeffekt durch die Applikation von TAA-1/DMSO postulieren (Abbildung 9).

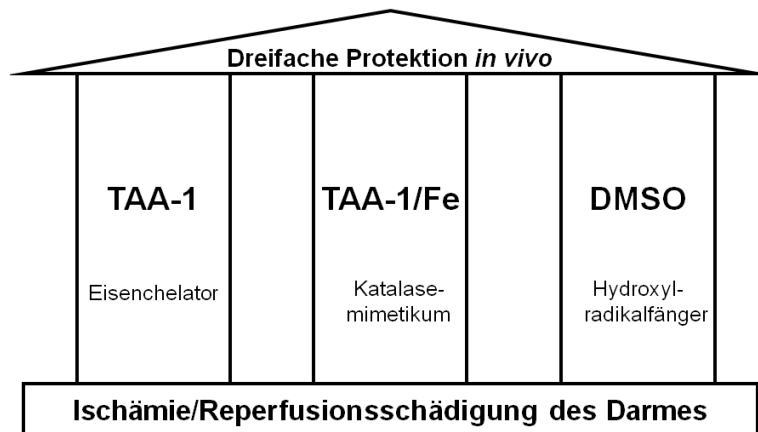


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Hypothese zur kombinierten *in vivo*-Protektion des Rattendünndarmes vor den Folgen der mesenterialen Ischämie-/Reperfusion: Protektion durch Chelatisierung von Eisenionen durch TAA-1, Protektion durch Abbau von H_2O_2 (TAA-1/Fe) als Katalasemimetikum und Protektion durch Inaktivierung des Hydroxylradikals (DMSO).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das Prodrug TAA-1 erstmalig *in vivo* am Rattenmodell (Kapitel 2.3.1) zur Dünndarmischämie und -reperfusion einzusetzen. Dabei sollte anhand intra- und postoperativer Untersuchungen von Vitalparametern, Blutwerten sowie histologischer und enzymatischer Aufarbeitung des Darmes (Kapitel 2.3.2) untersucht werden, ob die positiven Ergebnisse aus Zellkulturversuchen (Kapitel 1.4) auch im lebenden Organismus Relevanz haben und der Dünndarm vor einem Ischämie- und Reperfusionsschaden geschützt werden kann. Vorversuche dienten dabei zur Dosisfindung bzw. der Testung der geeigneten Applikationsform von TAA-1/DMSO.

Konkret sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Ist TAA-1/DMSO in der Lage, *in vivo* im Rattenmodell vor mesenterialem Ischämie-/Reperfusionsschaden zu schützen?
- Sind auftretende Effekte einer der beiden Substanzen (TAA-1 bzw. DMSO) zuzuordnen, wirken sie synergistisch oder heben sich Effekte gegenseitig auf?
- Gibt es schädigende Effekte durch TAA-1/DMSO oder DMSO? Addieren sich einzelne Toxizitäten?

Um eventuelle Effekte möglichst differenziert TAA-1 bzw. DMSO zuordnen zu können, wurden neben zwei TAA-1-Dosierungen zusätzlich in Kontrollgruppen die Effekte verschiedener DMSO-Dosierungen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Biofuge Primo Heraeus	Kendro Laboratory (Hanau, Deutschland)
Blood Gas Analyser ABL 715	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Canon 1000 D Digitalkamera	Canon (Krefeld, Deutschland)
Cardiff Aldasorber Medical Filter	Shirley Aldred (Sheffield, England)
Hamilton PB-600	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Repeating Dispenser	
Hamilton 1750	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
500 µl GASTIGHT Syringe	
Isofluran Vapor 19,3	Dräger (Lübeck, Deutschland)
Kleintier-OP-Tisch (heizbar) 13511	Medax (Rendsburg, Deutschland)
Komplettdruckmanschette K + S p	MediPlac (Borchen, Deutschland)
Leica KL 1500 LCD OP-Lampe	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Matrx Veterinary Anesthetic Gas	Midmark (Ohio, USA)
Scavenger	
Mikroskop Zeiss KF2	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Perfusor Secura FT	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Reference-Pipetten (100 µl, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM2235	Leica Biosysteme (Nussloch, Deutschland)
Schwingmühle	Retsch (Haan bei Düsseldorf, Deutschland)
Sirecust 1281 Touch Screen Monitor	Siemens (Essen, Deutschland)
Sulla 808 Narkosegerät	Dräger (Lübeck, Deutschland)
Thermomix BM Wasserbad	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
UV-VIS mini 1240 Spectrophotometer	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Vitalab Selectra E	VWR International (Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Operations-/Messmaterial

25-G Venofix-Kanülen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
3-Wege-Hahn	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Arterienknopfschere, 11,5 cm	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
BD Microlance 3 Kanülen, 23 G, blau, 1 ¼“, 0,6 x 30 cm	BD Microlance 3 (Franklin Lakes, USA)
Bulldog-Arterienklemme, 26 mm, gewinkelt, atraumatisch	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Chirurgische Standardschere, 13 cm	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Einwegspritzen, 1 ml, 2 ml	Terumo (Leuven, Belgien)
Falcon-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	BD (Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA)
Graefe-Pinzetten, gekrümmt	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Messküvetten, 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroschere, 8 cm gekrümmt	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Original-Perfusor-Leitung	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Original-Perfusor-Leitung, PE (PVC-frei)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Original-Perfusor Spritze 50 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Perma Handseide, geflochten	Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
PICO 50, 2 ml Probennehmer	Radiometer Medical ApS, (Brønshøj, Dänemark)
Pinzetten (chirurgisch und anatomisch)	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Pipettenspitzen (100 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Portex Katheter (Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,96 mm)	Smiths Medical International (Hythe, England)
Safe Seal Reagiergefäße, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.3 Medikamente

Isofluran	Abott (Wiesbaden, Deutschland)
Ketamin 10%	Ceva (Düsseldorf, Deutschland)
Lidocain (Xylocain 1%)	AstraZenica (Wedel, Deutschland)
NaCl 0,9% isotone Kochsalzlösung	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Ringer-Lösung Macoflex N	MacoPharma international (Langen, Deutschland)

2.1.4 Chemikalien

Aqua bidestillata	
2-Thiobarbitursäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
modifizierte Drabkin-Lösung (Inhaltsstoffe gelöst in 1000 ml Aqua bidest; pH 7,6 – 7,7)	
50 mg Kaliumcyanid	
200 mg Kaliumferricyanid (Kaliumhexacyanoferrat(III), $K_3[Fe(CN)_6]$)	
140 mg Monokaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	
1 ml Triton X-100	alles Merck (Darmstadt, Deutschland)
Eiweiß-Glycerin 3T 012	Waldeck (Saarbrücken, Deutschland)
Erythrosin	Waldeck Division Chroma (Münster, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin Lösung (10%, gepuffert)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Heparin (25000 i.E./5 ml)	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Mayers Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Medizinischer Sauerstoff	Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland)

Methylenblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Paraffin	McCormick Scientific (St. Louis, Missouri, USA)
Sulfosalizylsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TAA-1(di(2,2-dimethyl[1,3]dioxolo)benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraazacyclotetradeca-2,4,6,9,11-hexaen)	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. h.c. Sustmann und Dr. rer. nat. Korth (Institut für Organische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Deutschland)
1,1,3,3 Tetramethoxypropane (TMP)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

2.1.5 Synthese und Charakterisierung von TAA-1

Die Synthese von TAA-1 (di(2,2-dimethyl[1,3]dioxolo)benzo[b,i]-1,4,8,11-tetraazacyclotetradeca-2,4,6,9,11-hexaen) wurde von R. Sustmann [*Sustmann et al.*, 2007] ausführlich beschrieben. TAA-1 wurde durch ^1H -NMR, ^{13}C -NMR (NMR = Kernresonanzspektroskopie), IR (Infrarotspektroskopie) und HR-MS (high resolution mass spectrometry) komplett charakterisiert. Es stellte sich in der C,H,N-Elementaranalyse als analytisch rein dar.

Das dunkelbraune, in Pulverform vorliegende TAA-1 muss durch das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht werden. Bei Mischung von TAA-1 mit DMSO entsteht sofort eine dunkelbraune, klare Lösung.

2.1.5 Computerprogramme

<u>Programm</u>	<u>Herkunft</u>
XLSTAT 2010.1.01	Addisonsoft (Andernach, Deutschland)
CellExplorer Version 3.5	BioSciTec (Frankfurt am Main, Deutschland)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)

2.2 Versuchstiere

Männliche Wistar-Ratten (400 – 470 g) wurden aus dem zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen bezogen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten (konstante Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$; 12-stündiger Hell-/Dunkel-Wechsel) und erhielten freien Zugang zu Futter (Ssniff-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser. Um alle Tiere wurde sich entsprechend der geltenden Tierschutzgesetze gekümmert. Das experimentelle Modell wurde durch die lokale Ethik-Kommission und das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW genehmigt (TSG-Nummer des Tierantrags: G974/08).

2.3 Methoden

2.3.1 Tiermodell

2.3.1.1 Anästhesiologisches und operatives Basisvorgehen

Nach Gewichtsprüfung und Transport aus dem zentralen Tierlaboratorium wurden die Ratten zügig mittels Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert. Dazu wurde zunächst die Narkose in einer bereits mit Narkosegas gefluteten Narkosebox eingeleitet (2% Isofluran in 100% medizinischem Sauerstoff, Fluss von 4 l/min) und die Tiere bei ausreichend tiefer Anästhesie (erkennbar durch das Sistieren von Bewegungen von Extremitäten oder Augenlidern) bei vorhandener Spontanatmung auf eine Wärmeplatte mit maximaler Temperatur von 40°C mit Narkosemaske und angeschlossenem Isofluranverdampfer transferiert. Die Narkose wurde über den gesamten Versuchsverlauf mit 1,2 - 1,7% Isofluran bei 100% Sauerstoff bei einem Fluss von 0,5 l/min aufrechterhalten.

Zur Analgesie wurden 80 mg/kg KG Ketamin s.c. in die rechte Bauchwand injiziert. Gab es im weiteren Verlauf Anzeichen für Schmerzen bei der Ratte in Form von Blutdruckerhöhungen oder Wegziehen der Hinterpfote bei Kompression des Zehenzwischenraumes mit einer Pinzette, wurden weitere Dosen von Ketamin (20 mg/kg i.p.) in die dann offene Bauchhöhle appliziert oder die Narkose mittels Isofluran vertieft. Es wurde eine rektale Temperatursonde angelegt (Zieltemperatur: $\geq 37^{\circ}\text{C}$, $\leq 38^{\circ}\text{C}$) und die Ratte nachfolgend mit Alufolie bis zum Brustbein abgedeckt, um den Wärmeverlust zu minimieren. Um die arteriellen und venösen Katheter zur hämodynamischen Überwachung und Blutabnahme zu platzieren, wurden zur lokalen Betäubung 5 mg/kg KG Lidocain s.c. im Bereich des Operationsgebietes in die rechte und linke Halsseite appliziert.

Während der folgenden chirurgischen Maßnahmen wurde stets auf aseptisches Arbeiten geachtet. Abbildung 10 zeigt schematisch die wichtigsten arteriellen Gefäße einer auf dem Rücken liegenden Ratte.

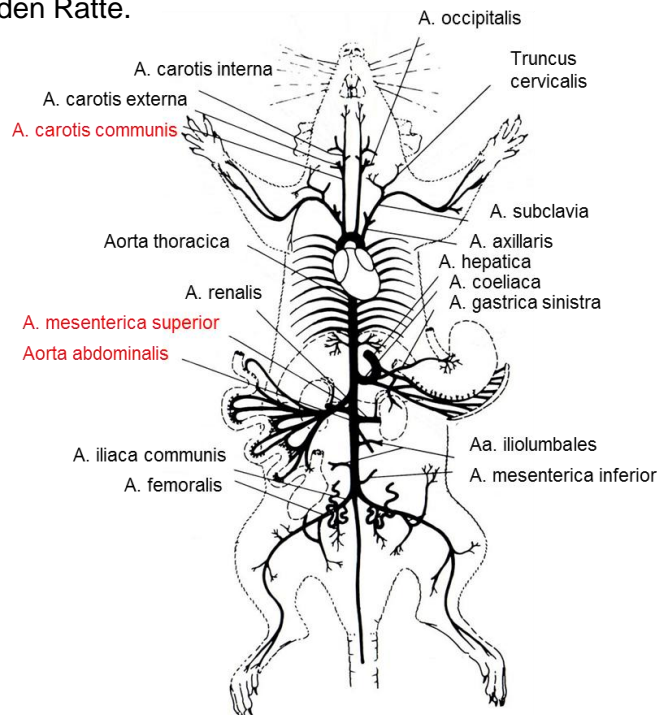


Abbildung 10: Schematische Übersicht über die wichtigsten Arterien der Ratte. Die *A. carotis communis* wurde zur invasiven Blutdruckmessung kanüliert, die *A. mesenterica superior* als Abgang der *Aorta abdominalis* abgeklemmt, um die mesenteriale Ischämie zu induzieren (modifiziert nach [Baker et al., 1979]).

Nach medianer Halsinzision und atraumatischer Präparation des subkutanen Bindegewebes mithilfe von Pinzette und Wattestäbchen wurde nach Identifikation und Durchtrennung des *Musculus omohyoideus* zunächst die linke *A. carotis communis* aufgesucht und vorsichtig vom *Nervus vagus* separiert, um eine Vagusreizung mit konsekutiver reflektorischer Bradykardie oder Asystolie zu vermeiden. Anschließend wurde die Arterie vorsichtig auf die Branchen einer kleinen Graefe-Pinzette aufgespannt und das kraniale Ende mittels Fadenligatur ligiert. Mit einer Gefäßschere wurde die *A. carotis* dann inzidiert und vorsichtig mit einem Portex-Katheter (verbunden mit einem Dreivegehahn und arteriellem Druckmesssystem) kanüliert, um eine kontinuierliche Blutdruck- und Pulsmessung sowie repetitive arterielle Blutgasanalysen zu ermöglichen. Der Katheter wurde mit einer zweiten Ligatur distal des Insertionsortes in der Arterie fixiert. Anschließend wurde die rechte *Vena (V.) jugularis interna* aufgesucht, vorsichtig freipräpariert und kanüliert, um Flüssigkeit (7 ml 0,9%ige NaCl-Lösung/kg KG x h) oder Testsubstanzen intravenös verabreichen zu können. Auch hier wurde der Katheter per Ligatur fixiert. Auf die nun folgende in Vor- und Hauptversuchen unterschiedliche Applikation der Testsubstanzen vor Induktion der mesenterialen Ischämie wird in den Kapiteln 2.3.1.2 und 2.3.1.3 bzw. 2.3.3 näher eingegangen.

Zur Induktion der Ischämie des Dünndarmes wurde entlang der *Linea alba* median laparotomiert, der Dünndarm vorsichtig mobilisiert und ohne Torsionen nach rechts aus der Bauchhöhle auf eine mit 0,9%iger NaCl-Lösung getränkte, körperwarme Kompresse gelegt. Es erfolgte die Identifikation und vorsichtige Freipräparation der *A. mesenterica superior* aus dem umgebenden Bindegewebe und der Beginn der Ischämiephase durch das Abklemmen der Arterie mit einer atraumatischen Mini-Bulldog-Klemme. Durch eine randständige Kollateralversorgung des Darmes durch Anastomosen (Kapitel 1.1.1) kann insgesamt von einer low-flow Ischämie ausgegangen werden. Das Abklemmen des richtigen Gefäßes wurde optisch durch das Fehlen von Pulsationen, durch das Entfärben des Dünndarms und hämodynamisch durch einen Blutdruckanstieg verifiziert. Der ausgelagerte Dünndarm wurde behutsam und ohne Torsionen in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Bauchhöhle mit auf Körpertemperatur angewärmter 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt, um den Wärme- und Flüssigkeitsverlust möglichst gering zu halten. Nach der Ischämiezeit von 90 Minuten wurde die Mini-Bulldog-Klemme entfernt und damit die Reperfusionphase von 120 Minuten eingeleitet.

Am Ende der Versuche wurde die Narkose der Tiere mit Isofluran vertieft (5% Isofluran bei erhöhtem Sauerstofffluss zum schnelleren Anfluten des Narkosegases) und der Dünndarm umgehend vom Magen bis zum Blinddarm reseziert. Das weitere Vorgehen mit dem nun resezierten Dünndarm wird im Kapitel 2.3.2.3 näher erläutert.

Anschließend wurde der Tod der Ratten durch kardiale Inzision herbeigeführt. In den Vorversuchen wurde eine Lagekontrolle des Katheters in der *V. jugularis interna* mit Methylenblau vorgenommen. Die Auswertung des Versuches erfolgte nur, wenn der Katheter eindeutig richtig lag, d.h. Methylenblau musste in das eröffnete Herz austreten; die Testsubstanz war somit korrekt intravenös infundiert worden.

2.3.1.2 Teststoffapplikation in den Vorversuchen

In den Vorversuchen wurde über den Katheter in der *V. jugularis interna* zunächst vor Ligatur der *A. mesenterica superior* über 30 Minuten die jeweilige Testsubstanz infundiert (1 ml/kg KG x h; Abbildung 11). Diese Art der Infusion wurde gewählt, um präischämisch langsam (zur Minimierung möglicher Nebenwirkungen) einen Teststoffspiegel im Blut und somit im Darmgewebe aufzubauen. Anschließend wurde die *A. mesenterica superior* abgeklemmt (Kapitel 2.3.1.1) und die Ischämiezeit begonnen. Nach 60 Minuten Ischämie wurde die Testsubstanz erneut mit 1 ml/kg KG x h, dieses Mal für 90 Minuten infundiert (30 Minuten der Ischämiezeit, 60 Minuten der Reperusionszeit; Gesamtmenge der Infusion über die Versuchsdauer 2 ml/kg KG). Da der Dünndarm während des Großteils

der Ischämiezeit nur über Kollateralkreisläufe perfundiert wird und somit nur eine geringe Menge der Testsubstanz das Darmgewebe erreichen kann, wurde die Infusion der Testsubstanz während der ischämischen Phase für 60 Minuten unterbrochen. 30 Minuten vor Reperfusion wurde die Infusion erneut gestartet, um die Blut- und Gewebespiegel der jeweiligen Testsubstanz vor der Reperfusion wieder zu erhöhen.

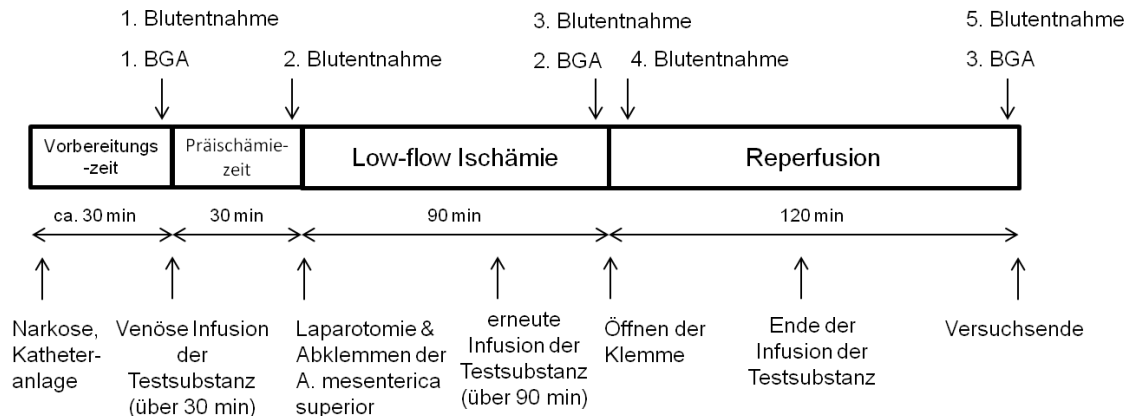


Abbildung 11: Schematischer Versuchsablauf der Vorversuche: Übersicht über Zeitpunkte der Blutentnahmen bzw. Blutgasanalysen (BGA), Infusionszeiten der Testsubstanzen sowie Ischämie- und Reperfusionszeiten.

Da TAA-1 gelöst in DMSO nicht gleichzeitig mit 0,9%iger NaCl-Lösung über den V. jugularis-Katheter applizierbar war (eine Verdünnung des DMSO durch die NaCl-Lösung führte zum Ausfallen von TAA-1), wurde entschieden, die nötige Flüssigkeitssubstitution mit 0,9%iger NaCl-Lösung per Bolusapplikationen über die A. carotis communis zu realisieren. Dazu bekamen die Versuchstiere alle 10 Minuten gewichtsadaptierte langsam injizierte Flüssigkeitsboli, deren Gesamtmenge einer Flüssigkeitssubstitution von 7 ml/h x kg KG entsprach.

2.3.1.3 Teststoffapplikation in den Hauptversuchen

In den Vorversuchen haben sich einige Schwierigkeiten in der Applikation von TAA-1 mit DMSO oder auch von DMSO alleine ergeben. Dazu gehörte die unzureichende Mischbarkeit von TAA-1/DMSO mit 0,9%iger NaCl-Lösung und damit verbunden die Notwendigkeit, den venösen Katheter nur für die Infusion von TAA-1/DMSO zu benutzen. So musste Flüssigkeit unphysiologisch in Form von arteriellen Bolusapplikationen zugeführt werden. Auch die Eigenschaft von DMSO, Perfusor- oder allgemein Plastikmaterialien durch Herauslösen von PVC in ihrer Konsistenz zu verändern war problematisch, deswegen wurden spezielle PVC-freie Perfusorleitungen benutzt. Über die Gesamtdauer des Versuches betrachtet war das Herauslösen einer unklaren Menge von chemischen Stoffen aus weiteren Materialien wie beispielsweise aus dem Portex-Katheter

jedoch nicht auszuschließen. Des Weiteren wurden in den Vorversuchen recht große DMSO-Volumina infundiert (aufgrund der erforderlichen Mindestförderleistung des Perfusors), was zu einer Hämolyse führen kann (Kapitel 4.2.2.2). Daher wurde die Applikation von TAA-1/DMSO in den Hauptversuchen modifiziert.

Direkt nach der Insertion der Katheter wurde median laparotomiert (Kapitel 2.3.1.1), der Dünndarm mobilisiert und nach links aus der Bauchhöhle auf eine mit 0,9%iger NaCl-Lösung getränkte körperwarmer Komresse gelegt. Es wurde die *V. cava inferior* identifiziert und die jeweils zu infundierende Substanz (Kapitel 2.3.3.2) mit Hilfe einer Venofix-Kanüle, einer Hamilton-Spritze und eines Dispensers in Boli von 10 µl/min über maximal zehn Minuten appliziert (Abbildung 12).

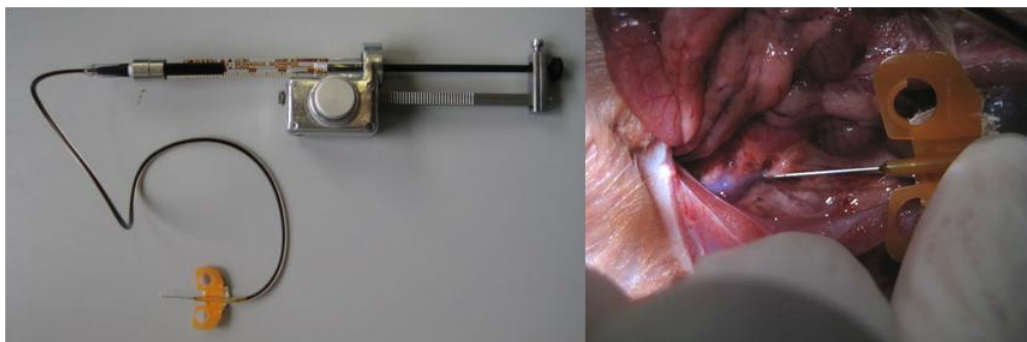


Abbildung 12: Applikation von TAA-1/DMSO (dunkelbraune Lösung) mithilfe einer Hamilton-Spritze, eines Dispensers und einer Venofix-Kanüle direkt in die *V. cava inferior*.

Der Dünndarm wurde ohne Torsionen zurückverlagert und der Bauchraum mit körperwarmer 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt. 30 Minuten nach Beginn der Applikation der Substanzen wurde die Ischämie induziert (Kapitel 2.3.1.1). Die Flüssigkeitssubstitution erfolgte hier über Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung in die *V. jugularis interna* (7 ml/h x kg KG). Der schematische Ablauf der Durchführung ist in Abbildung 13 dargestellt.

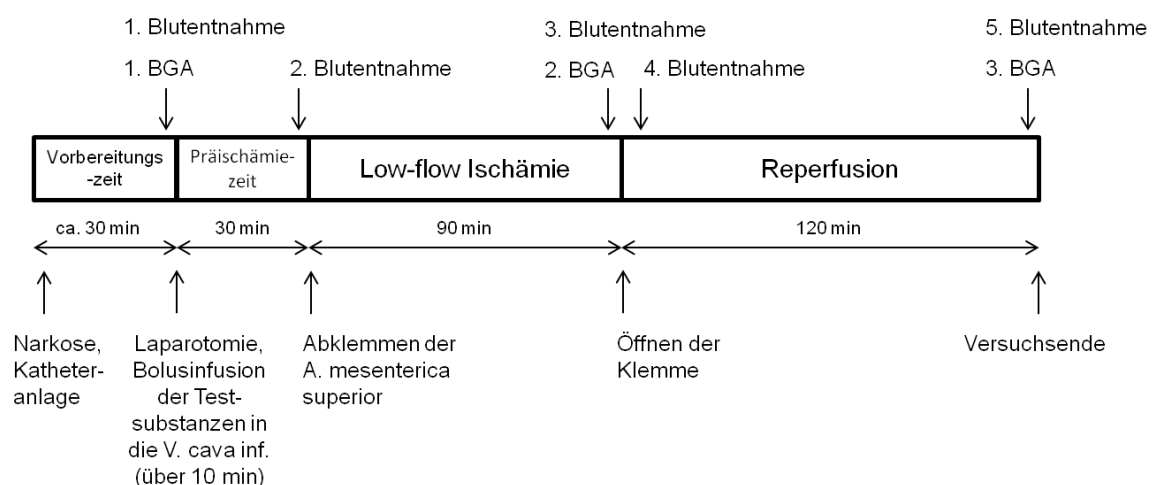


Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf der Hauptversuche: Übersicht über Zeitpunkte der Blutentnahmen bzw. Blutgasanalysen (BGA), Applikationszeitpunkt der Testsubstanzen sowie Ischämie- und Reperfusionszeiten. *V. cava inf.* = *Vena cava inferior*.

2.3.2 Messungen und Bestimmungen

2.3.2.1 Biomonitoring der Vitalparameter

Von der Narkoseeinleitung an bis zum Tod des Tieres wurden die Parameter des Biomonitorings kontrolliert und in zehnminütigen Abständen notiert. Der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck (MAP, **mean arterial pressure** in mmHg) wurden kontinuierlich über den Katheter in der *A. carotis* gemessen. Als zusätzliches Maß für die Qualität des arteriellen Blutdrucks erfolgte eine subtherapeutische Volumensubstitution: falls der systolische Blutdruck für mehr als fünf Minuten unter 90 mmHg fiel, wurden Boli von 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung über den arteriellen Katheter appliziert. Das maximal pro Stunde applizierte Volumen betrug dabei 5 ml NaCl 0,9%/kg KG. Die Herzfrequenz in Schlägen pro Minute wurde anhand der Spikes der arteriellen Blutdruckkurve gezählt, die Atemfrequenz visuell anhand der Thoraxexkursionen ermittelt. Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Temperatursonde gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, die Temperatur mithilfe einer beheizbaren Wärmeplatte und durch das Abdecken des Tieres mit Alufolie zwischen $\geq 37^{\circ}\text{C}$ und $\leq 38^{\circ}\text{C}$ zu halten.

2.3.2.2 Blutgasanalysen und Enzymaktivitäten im Blutplasma

Mithilfe von 2 ml-PICO50-Spritzen (mit 80 i.E. elektrolybalanciertem Heparin) oder in den Vorversuchen mithilfe von mit 50 i.E. gefüllten 1 ml-Insulinspritzen wurden Blutproben (0,7 ml) aus dem arteriellen Katheter gewonnen. Insgesamt fünf Mal wurde Blut für die Bestimmungen von Enzymaktivitäten (und drei Mal für Blutgasanalysen s.u.) arteriell entnommen: direkt nachdem der Katheter platziert worden war; vor der Induktion der Ischämie; am Ende der ischämischen Zeit; sowie fünf und 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion. Nach jeder Blutentnahme wurden die Tiere mit der gleichen Menge 0,9%iger NaCl-Lösung flüssigkeitssubstituiert.

Durch Zentrifugation ($3\,000 \times g$ für 15 Minuten bei 25°C) wurde Blutplasma gewonnen, abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. Innerhalb von vier Stunden wurden die Plasmaaktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) mit einem vollautomatischen Analyzer (Vitalab Selectra E) bestimmt. Die Aktivitäten der Plasmaenzyme wurden als generelle Indikatoren für Zell- und Gewebeschaden – am wahrscheinlichsten im Dünndarm und in der Leber – gewertet. Zusätzlich wurden insgesamt drei Blutgasanalysen durchgeführt: zu Beginn des Versuchs, am Ende der Ischämiezeit und am Ende der Reperfusion.

Folgende Werte wurden mit dem Blutgasanalysator ABL 715 ermittelt:

▪ Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdrücke	pO ₂ , pCO ₂ [mmHg]
▪ Sauerstoffsättigung	sO ₂ [%]
▪ pH-Wert	
▪ Bikarbonat	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]
▪ Base Excess	BE [mmol/l]
▪ Hämoglobin-Konzentration	ctHb [g/dl]
▪ Hämatokrit	Hkt [%]
▪ Elektrolyte: Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ [mmol/l]
▪ Metabolische Parameter: Glukose, Laktat	Glu [mg/dl], Lac [mmol/l]
▪ Osmolalität	mOsm [mmol/kg]

2.3.2.3 Lokale Quantifizierung der Darmschädigung

2.3.2.3.1 Beurteilung des makroskopischen Zustandes des Dünndarms

Am Ende der Reperfusion wurde der komplette Dünndarm vom Magen bis zum Zökum reseziert, möglichst vollständig von dem ihm anhaftenden Mesenterium befreit und in zehn gleichgroße Stücke von etwa zehn Zentimeter Länge geschnitten. Aus der Mitte von Segment fünf wurde ein zwei Zentimeter langes Darmstück entnommen und in Formalin fixiert (10%, neutral gepuffert). Alle restlichen Segmente wurden rasch in mit eisgekühltem Puffer (4°C, 140 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4) versehene Petrischalen transferiert und kontinuierlich auf Eis gelagert. Die einzelnen Darmstücke wurden entlang der Mesenterialwurzel aufgeschnitten und mithilfe feiner Nadeln auf Styroporplatten aufgespannt und so photographisch dokumentiert. Dabei wurden die Darmstücke ständig von kalter Pufferlösung (4°C) umspült. Anschließend wurde der Schweregrad der Schädigung von jedem der Darmsegmente wie folgt anhand des am Institut für Physiologische Chemie (Universitätsklinikum Essen) etablierten **Makroscores** quantifiziert [*Petrat et al.*, 2010]:

Grad 0: keine sichtbare Veränderung

Grad 1: vereinzelte petechiale Einblutungen mit oder ohne fokaler Verteilung

Grad 3: leichte lokale Einblutung ohne Verfärbung der kompletten Darmwand

Grad 9: massive Einblutungen mit dunkelroter Verfärbung der kompletten Darmwand

Der Anteil der verschiedenen makroskopischen Grade (0, 1, 3, 9; Abbildung 14) wurde in Prozent der Fläche eingeschätzt; es wurde ein mittlerer Wert für jedes Darmsegment

gebildet und die durchschnittliche Schädigung aller Dünndarmsegmente für die Beurteilung der Schädigung des gesamten Darmes bestimmt.

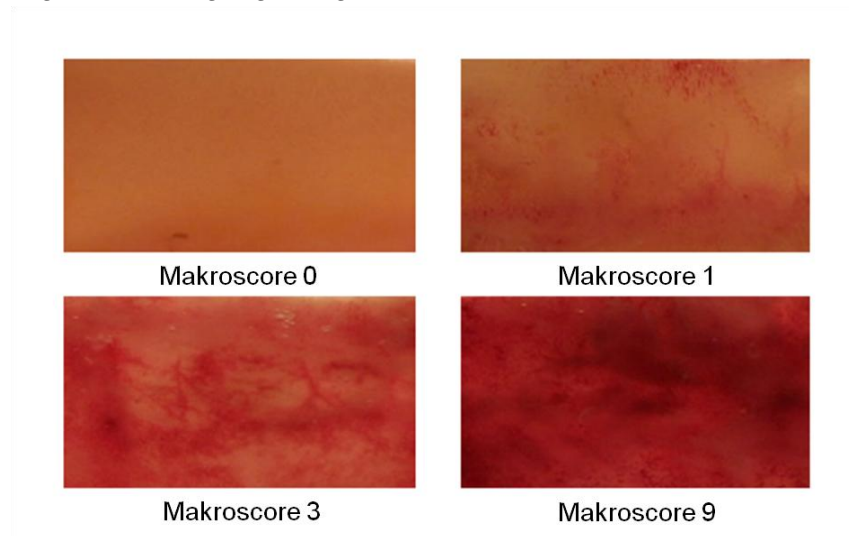


Abbildung 14: Beispielbilder für den Makroscore: Grad 0: keine sichtbare Veränderung; Grad 1: vereinzelte petechiale Einblutungen mit oder ohne fokaler Verteilung; Grad 3: leichte lokale Einblutung ohne Verfärbung der kompletten Darmwand; Grad 9: massive Einblutungen mit dunkelroter Verfärbung der kompletten Darmwand.

2.3.2.3.2 Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Dünndarmhomogenates

Nach Bestimmung des Makroscores wurde jedes der zehn Darmsegmente halbiert und in jeweils 1 ml Homogenisierungspuffer [140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 Tablette Complete Proteaseinhibitorcocktail/ 50 ml, pH = 7,4 bei 4°C, versetzt mit 20 µM BHT (butyliertes Hydroxytoluol; 20 mM Stammlösung aus 4,4 mg BHT gelöst in 1 ml 100% Ethanol)] in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Schwingmühle für 15 Minuten homogenisiert. BHT diene in diesem Zusammenhang der Verhinderung einer durch die Aufarbeitung induzierten Lipidperoxidation. Die Gesamtmenge an Darmhomogenat wurde notiert und anschließend bei 16000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden sofort abpipettiert, in einem Falcon-Röhrchen gemischt und auf Eis (4°C) gelagert.

Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Dünndarmhomogenates erfolgte anhand der Methode nach Drabkin: Hierbei wird vorhandenes Hämoglobin durch Kaliumferricyanid zu Hämglobin oxidiert, welches durch Kaliumcyanid zu Hämglobincyanid umgesetzt wird und so einem Nachweis zugänglich ist [Bachmann, 1978]. In Doppelansätzen wurden 0,25 ml Darmhomogenatüberstand mit 1 ml modifizierter Drabkin-Lösung (Bestandteile: Kapitel 2.1.4) versetzt und nach fünf Minuten die Absorption von Hämglobincyanid bei 543 nm bestimmt. Anschließend wurde der Wert um die unspezifische Absorption bei 700 nm korrigiert. Die Hämoglobinkonzentration der Darmhomogenatüberstände wurde anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des

Hämiglobincyanid-Tetramers ($44000 \text{ mol/l cm}^{-1}$) berechnet. Als Küvettenleerwert diene die modifizierte Drabkin-Lösung ohne Zusätze [Petrat und de Groot, 2011].

2.3.2.3.3 Bestimmung der TBARS im Dünndarmhomogenat

Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (= Thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) sind ein Maß für die Lipidperoxidation, da sie als Nebenprodukt entstehen [Lutz et al., 1990]. Bei der Lipidperoxidation (Kapitel 1.1.6, 1.2 und 4.2.1.1) werden Membranlipide (vor allem ungesättigte Fettsäuren) durch reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale oxidiert, wodurch Fettsäureradikale entstehen, die wiederum mit Sauerstoff reagieren und Lipidperoxyradikale bilden. In einer Kettenreaktion reagieren immer mehr vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit Radikalen, es kommt zur Bildung von Lipid-Hydroperoxiden [Löffler und Petrides, 2003]. Bei dieser Peroxidation entstehen auch kleine Mengen Malondialdehyd. Dieses bildet mit Thiobarbitursäure einen Farbstoffkomplex, dessen Absorption bei 532 nm im Photometer bestimmt und so als Nachweis und Maß für die Lipidperoxidation genutzt werden kann [Esterbauer und Cheeseman, 1990].

Der Test wurde in Doppelansätzen mit Proben, Probenkontrollen (als Probenleerwert) und Standards durchgeführt. Für die Proben und Probenkontrollen wurde zunächst jeweils 1 ml Darmhomogenatüberstand mit 100 µl Sulfosalizylsäure (27,5%ig) vermischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte bei den Proben die Zugabe von 550 µl TBA (Thiobarbitursäure; 1%, pH 7,0), bei den Probenkontrollen die Zugabe von 550 µl Aqua bidestillata. Die Ansätze wurden weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurde der Standard angesetzt, bei dem 1 ml TMP-Lösung (1,1,3,3-Tetramethoxypropan; 10 µM in Homogenisierungspuffer) mit 100 µl Sulfosalizylsäure vermischt, 10 Minuten inkubiert und anschließend mit 550 µl TBA versetzt wurde. Auch der Standard wurde 20 Minuten bei gleichen Bedingungen wie die Proben(kontrollen) inkubiert. Alle Ansätze wurden nach Ende der Inkubationszeit im Wasserbad für 60 Minuten auf 100°C erhitzt und im Anschluss daran zentrifugiert (15 Minuten bei 16 000 x g, 25°C). Die Absorption des Überstandes wurde im Photometer bei 532 nm gegen Homogenisierungspuffer als Küvettenleerwert gemessen. Die Ergebnisse der Proben wurden um die unspezifische Absorption der Probenkontrollen korrigiert. Anhand der Werte des TMP-Standards wurde der TBARS-Gehalt des Darmhomogenates errechnet (µmol/kg).

2.3.2.3.4 Histologische Beurteilung der Schädigung des Dünndarmes

Das Gewebestück von Segment fünf (Kapitel 2.3.2.3.1) wurde für mindestens 24 Stunden in Formalin (10%, gepuffert) fixiert, in Paraffin gebettet, mit dem Rotationsmikrotom in 2 µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Färbung erfolgte im Färbeautomaten durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen. Histopathologische Veränderungen des Dünndarms wurden lichtmikroskopisch auf einer Skala von 0 bis 8 entsprechend einer Adaptation des **Park-Chiu-Scores** [Chiu et al., 1970; Park et al., 1990; Quaedackers et al., 2000] bewertet (Abbildung 15).

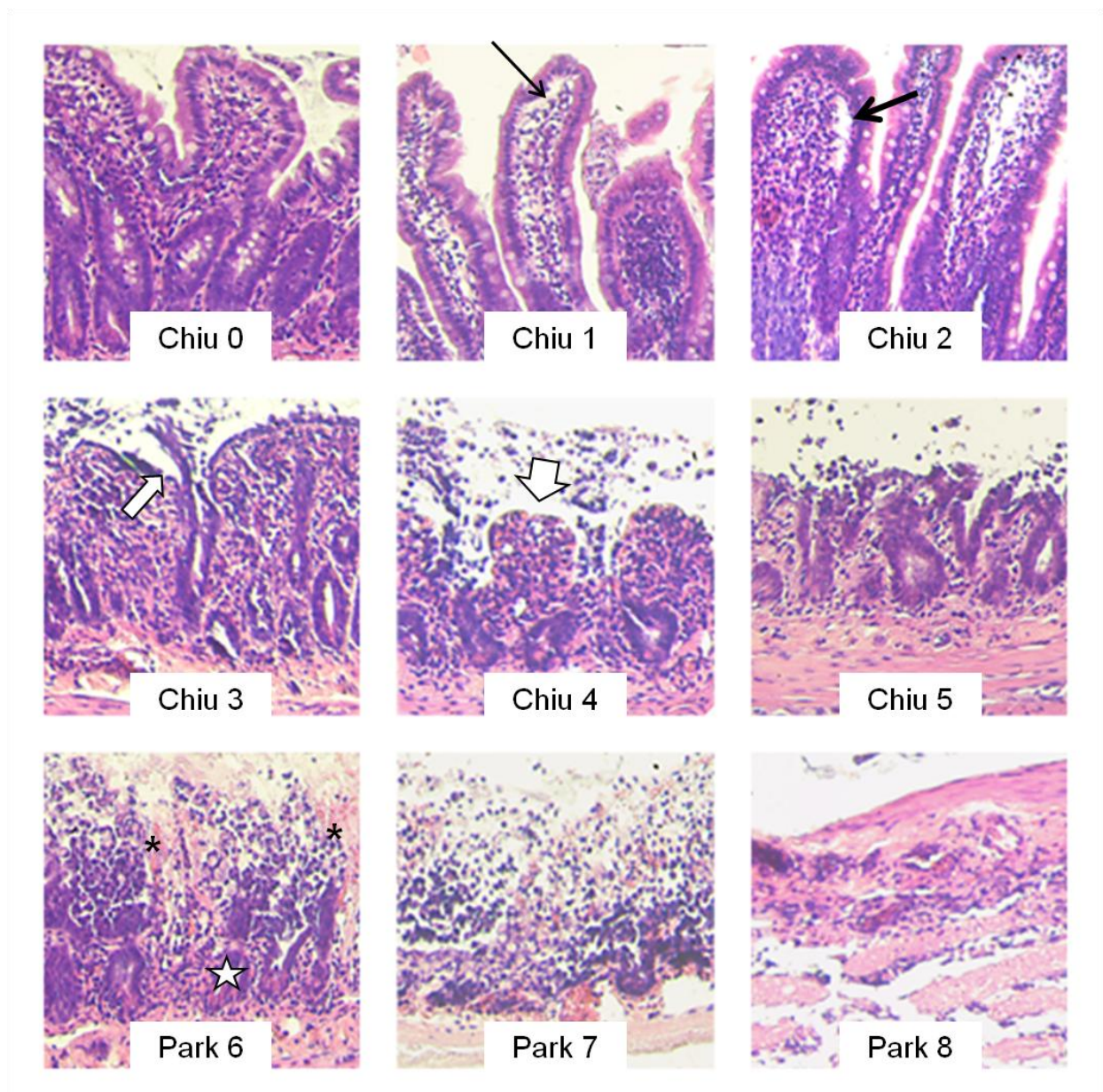


Abbildung 15: Fotos histopathologisch repräsentativer Schnitte des Rattendünndarms (Originalvergrößerung 200x) nach 60 Minuten mesenterialer Ischämie und 120 Minuten Reperfusion.

Park-Chiu-Score

Chiu 0: normale Mukosa;

Chiu 1: subepithelialer Grünhagenraum an der Villusspitze →

Chiu 2: größerer subepithelialer Raum →

Chiu 3: epitheliale Ablösung am lateralen Villus ⇨

Chiu 4: „nackte“ Villi ohne Epithel ⇨

Chiu 5: Verlust/Zerstörung der Lamina propria der Villi

Park 6: Kryptenschädigung (☆), Blutungen (★)

Park 7: transmukosale Infarzierung

Park 8: transmuraler Infarkt

2.3.2.3.5 Histologische Bestimmung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten

Weitere 2 µm dicke Schnitte aus Segment fünf wurden basierend auf der ASDCL- (Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase) Reaktion gefärbt, um die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Dünndarm sichtbar zu machen (Abbildung 16). Die Präsenz der Granulozyten wurde quantifiziert, indem die leuchtend rot angefärbten Zellen pro Fläche (mm²) gezählt wurden. Die Flächen wurden mithilfe des Programms CellExplorer computerassistent bestimmt.

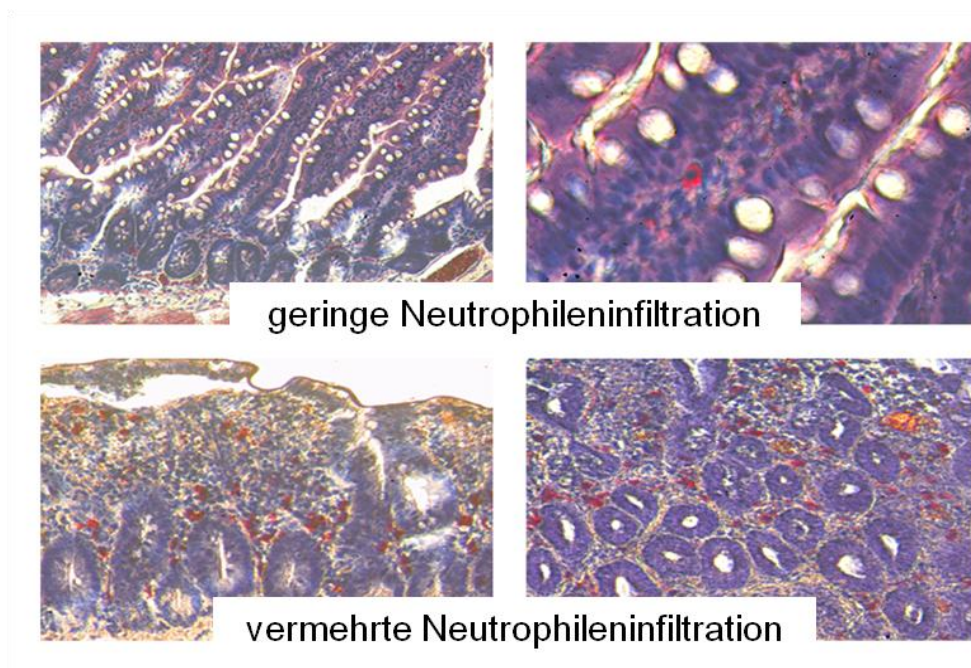


Abbildung 16: Nachweis neutrophiler Granulozyten im Dünndarmgewebe der Ratte (Vergrößerung 200x bis 400x). Die Neutrophilen wurden basierend auf der ASDCL- (Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase) Reaktion rot angefärbt.

2.3.3 Versuchsansätze und Versuchsplanung

2.3.3.1 Versuchsgruppen der Vorversuche

Die Vorversuche wurden mit drei bis sechs Tieren pro Gruppe durchgeführt mit dem Ziel, die Effekte von zwei verschiedenen TAA-1-Dosierungen, einer I/R-Kontrollgruppe (0,9%ige NaCl-Lösung) und einer DMSO-Kontrollgruppe im Modell der mesenterialen Ischämie/Reperfusion der Ratte zu vergleichen.

TAA-1 wurde jeden Tag frisch in 99,9%igem DMSO gelöst. TAA-1, DMSO oder 0,9%ige NaCl-Lösung wurden für 30 Minuten präischemisch infundiert, sowie anschließend für 90 Minuten ab 30 Minuten vor Beginn der Reperfusion (Kapitel 2.3.1.2).

Eine normoxische Kontrollgruppe von drei Versuchstieren wurde exakt den gleichen chirurgischen Maßnahmen unterzogen mit dem Unterschied, dass die *A. mesenterica superior* nicht abgeklemmt und so keine mesenteriale Ischämie/Reperfusion induziert wurde. Die folgenden Gruppen wurden verglichen (Tabelle 1):

Name der Gruppe	Dosis (/kg KG)	Menge DMSO (g/kg KG)	c DMSO (mol/L/kg KG)	
normox. Kontrolle	2 ml 0,9% NaCl	0	0	n = 3
I/R Kontrolle	2 ml 0,9% NaCl	0	0	n = 6
I/R 13,4 mg TAA-1	13,4 mg TAA-1/ 2 ml DMSO	2,2	0,433	n = 6
I/R 2,6 mg TAA-1	2,6 mg TAA-1/ 2 ml DMSO	2,2	0,433	n = 5
I/R 2 ml DMSO	2 ml DMSO	2,2	0,433	n = 6

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen der Vorversuche, die applizierte Dosis TAA-1 pro kg KG, sowie die DMSO-Dosis pro kg KG, die entsprechende DMSO-Menge (mg/kg KG), die DMSO-Stoffmengenkonzentration (c; bezogen auf ein durchschnittliches Blutvolumen von 65 ml/kg Ratte) und die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe (n). Bei der normoxischen (normox.) Kontrolle wurde keine Ischämie/Reperfusion (I/R) induziert.

2.3.3.2 Versuchsgruppen der Hauptversuche

Die Hauptversuche wurden mit vier bis sechs Tieren pro Gruppe durchgeführt mit dem Ziel, die Effekte von zwei verschiedenen TAA-1-Dosierungen, drei verschiedenen DMSO-Dosierungen und einer I/R-Kontrolle mit 0,9%iger NaCl-Lösung miteinander zu vergleichen. TAA-1 wurde jeden Tag frisch in 99,9%igem DMSO gelöst. Alle Substanzlösungen wurden 30 Minuten vor Induktion der Ischämie als Bolus über zehn Minuten appliziert (Kapitel 2.3.1.3).

Eine normoxische Kontrollgruppe wurde auch hier exakt den gleichen chirurgischen Maßnahmen unterzogen, die *A. mesenterica superior* aber nicht abgeklemmt und nur 0,9%ige NaCl-Lösung in die *V. cava inferior* injiziert.

Die folgenden Gruppen wurden verglichen (Tabelle 2):

Name der Gruppe	Dosis (/kg KG)	Menge DMSO (g/kg KG)	c DMSO (mol/L/kg KG)	
normox. Kontrolle	200 µl 0,9% NaCl	0	0	n = 4
I/R Kontrolle	200 µl 0,9% NaCl	0	0	n = 6
I/R 2,6 mg TAA-1	2,6 mg TAA-1/ 200 µl DMSO	0,22	0,043	n = 6
I/R 0,5 mg TAA-1	0,5 mg TAA-1/ 200 µl DMSO	0,22	0,043	n = 6
I/R 200 µl DMSO	200 µl DMSO	0,22	0,043	n = 6
I/R 50 µl DMSO	50 µl DMSO	0,055	0,011	n = 6
I/R 10 µl DMSO	10 µl DMSO	0,011	0,002	n = 6

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen der Hauptversuche, die applizierte Dosis TAA-1 pro kg KG, sowie die DMSO-Dosis pro kg KG, die entsprechende DMSO-Menge (mg/kg KG), die DMSO-Stoffmengenkonzentration (c; mol/L; bezogen auf ein durchschnittliches Blutvolumen von 65 ml/kg Ratte) und die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe (n). Bei der normoxischen (normox.) Kontrolle wurde keine Ischämie/Reperfusion (I/R) induziert.

2.3.4 Statistische Methoden

Die Vor- und Hauptversuche wurden mit drei bis sechs Tieren pro Versuchsgruppe durchgeführt. Alle biochemischen Untersuchungen wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Die gezeigten mikro- und makroskopischen Bilder sind repräsentativ für die jeweiligen Versuchsergebnisse. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of the Mean; Standardfehler). Vergleiche zwischen den verschiedenen Gruppen wurden durchgeführt, indem eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte die Fisher post-hoc Analyse. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

Die Vorversuche wurden mit dem Ziel durchgeführt, TAA-1/DMSO zum ersten Mal *in vivo* im Rattenmodell zu I/R-Schädigung des Dünndarms zu testen. Dabei wurden zunächst die generelle Reaktion auf TAA-1, die verschiedenen Dosen sowie eine mögliche Applikationsform untersucht und das Versuchsmodell anschließend für die Hauptversuche modifiziert (Kapitel 2.3.1.3).

3.1.1 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf Vitalparameter und Veränderungen von Plasmaenzymaktivitäten während mesenterialer Ischämie/Reperfusion

3.1.1.1 Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck

In der normoxischen Gruppe fand sich über die gesamte Versuchsdauer ein konstanter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) um 100 mmHg (Abbildung 17). Abgesehen von einer Blutdruckspitze kurz nach Induktion der Ischämie durch Okklusion der *A. mesenterica superior*, blieb der MAP bei allen Versuchsgruppen konstant bei 85 -100 mmHg während der präischemischen und der ischämischen Phase. Nachdem die *A. mesenterica superior* wieder geöffnet wurde, fiel in der Reperfusion bei allen I/R-Gruppen der Blutdruck signifikant. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, nur die Tendenz zu einem geringeren Abfall des MAP in der 2,6 mg TAA-1-Gruppe (auf 80 – 90 mmHg). Dahingegen konnte in der 2 ml DMSO-Gruppe der stärkste Abfall des MAP beobachtet werden (auf 60 – 70 mmHg).

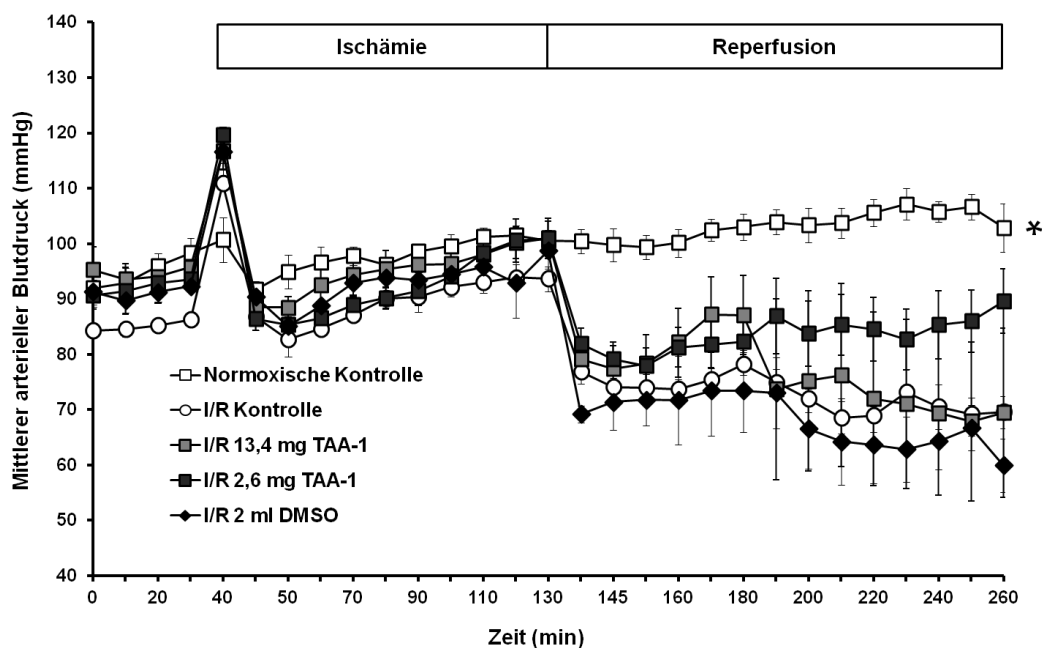


Abbildung 17: Einfluss von TAA-1 und DMSO auf den mittleren arteriellen Blutdruck männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. TAA-1/DMSO bzw. DMSO alleine wurden zunächst für 30 Minuten vor Induktion der Ischämie infundiert und dann wieder 30 Minuten vor Ende der Ischämie, dieses Mal für 90 Minuten (30 Minuten in der Ischämiezeit, 60 Minuten in der Reperusionszeit). In der normoxischen bzw. der I/R-Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige NaCl-Lösung mit derselben Rate infundiert (1 ml/kg x h). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle während der gesamten Reperusionsphase).

3.1.1.2 Einfluss auf Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körpertemperatur

Die Tiere der Versuchsgruppen hatten eine nicht signifikant unterschiedliche basale Herzfrequenz um 280 Schläge/min. Die Herzfrequenz der normoxischen Kontrollgruppe blieb während der gesamten Versuchsdauer konstant zwischen 280 – 310 Schlägen pro Minute (Abbildung 18). Nach Abklemmen der *A. mesenterica superior* kam es parallel zur Erhöhung des MAP zu einem temporären Abfall der Herzfrequenz um ca. 20 Schläge/Minute. Innerhalb der nächsten Minuten normalisierte sich die Herzfrequenz auf ähnliche Werte wie vor Induktion der Ischämie (250 – 275 Schläge/Minute). Insgesamt lagen die Herzfrequenzen der I/R-Gruppen in der Ischämiephase signifikant niedriger als in der normoxischen Kontrolle. Nach Wiedereröffnung der Arterienklemme und Beginn der Reperfusion fiel die Herzfrequenz der I/R-Gruppen erneut kurzzeitig um ca. 20 Schläge/Minute, um im Verlauf der Reperusionsphase stetig anzusteigen. Am Ende des Versuchs betrugen die mittleren Herzfrequenzen 280 – 300 Schläge/Minute. Die I/R 2,6 mg TAA-1-Gruppe zeigte tendenziell sowohl während der Ischämie- als auch der Reperusionsphase eine höhere Herzfrequenz als alle anderen I/R-Gruppen.

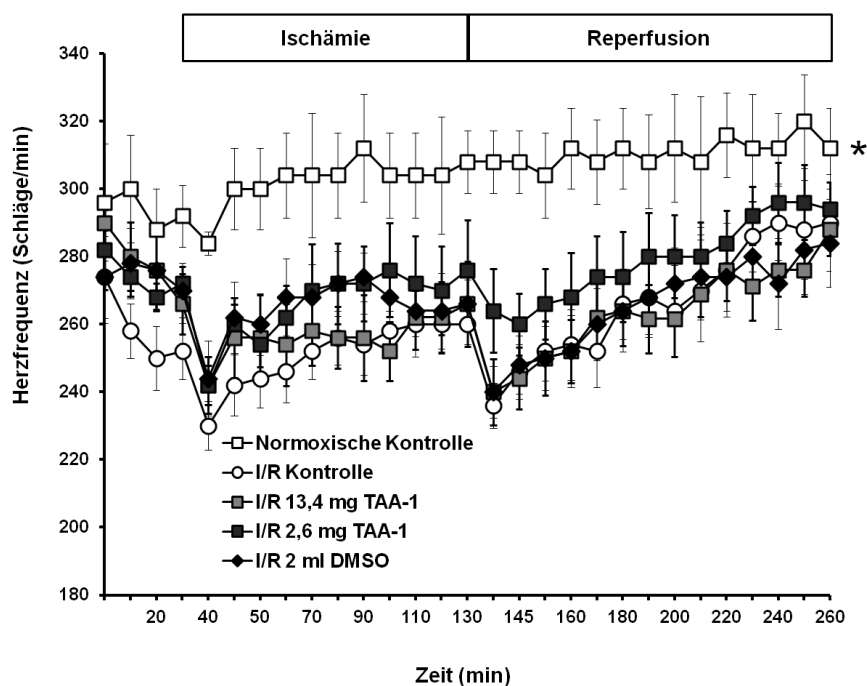


Abbildung 18: Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die Herzfrequenz männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. TAA-1/DMSO bzw. DMSO alleine wurden zunächst für 30 Minuten vor Induktion der Ischämie infundiert und dann wieder 30 Minuten vor Ende der Ischämie, dieses Mal für 90 Minuten (30 Minuten in der Ischämiezeit, 60 Minuten in der Reperusionszeit). In der normoxischen bzw. der I/R-Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige NaCl-Lösung mit derselben Rate infundiert (1 ml/kg x h). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle während der Ischämie- und Reperusionsphase bis Minute 200).

Während die Atemfrequenz in der normoxischen Gruppe im Verlauf des Versuches nur leicht von 50 auf 55 Atemzüge pro Minute anstieg (ohne Abbildung), sank die Atemfrequenz der I/R-Gruppen zunächst geringfügig am Anfang der Ischämiephase auf 45 – 50 pro Minute, um im Verlauf der Ischämie- und der Reperfusionsphase kontinuierlich auf 55 – 65 Atemzüge/Minute anzusteigen. Die einzelnen I/R-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in ihrem Verhalten bezüglich der Atemfrequenz.

Der Verlauf der Körpertemperatur verhielt sich ähnlich in allen Versuchsgruppen (ohne Abbildung). Nach Absinken der Temperatur während und kurz nach Eröffnung des Bauchraumes (auf 36,5 °C), stieg die Körpertemperatur bis Ende der Reperfusionsphase bei allen Tieren auf maximal 37,5°C an.

3.1.1.3 Einfluss auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Blutplasma

Im Verlauf des Versuches kam es bei der normoxischen Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Anstieg der LDH-, AST- und ALT-Aktivitäten im Blutplasma. In allen I/R-Gruppen hingegen stiegen am Ende der Ischämie, fünf Minuten nach Beginn und am Ende der Reperfusion alle drei Plasmaenzymaktivitäten signifikant an (Abbildung 19). Besonders deutlich wurde die Erhöhung der Plasmaenzymaktivitäten am Ende der Reperfusion. Zwar lagen die LDH-Werte bei der 13,4 mg TAA-1- und der 2 ml DMSO-Gruppe bereits am Ende der Ischämie signifikant über der I/R-Kontrollgruppe (Abbildung 19 A). Am Ende der Reperfusion konnten jedoch bei beiden TAA-1-Gruppen sogar doppelt bis dreifach höhere LDH-Werte gemessen werden (751 ± 260 U/L bzw. 686 ± 262 U/L) als bei der I/R-Kontrollgruppe (255 ± 44 U/L). Bei der 2 ml DMSO-Gruppe war die LDH-Plasmaaktivität sogar um den Faktor fünf erhöht (1345 ± 354 U/L).

Beim Vergleich der AST- und ALT-Aktivitäten unterschieden sich die Werte der I/R-Kontrollgruppe und der beiden TAA-1-Gruppen nicht wesentlich, weder am Ende der Ischämie noch am Ende der Reperfusion. Lediglich in der 2 ml DMSO-Gruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg beider Enzymaktivitäten vor allem am Ende der Reperfusion (127 ± 15 U/L AST bzw. 148 ± 13 U/L ALT; Abbildung 19 B und C).

Auffällig ist, dass die ALT-Aktivität sogar vor Beginn der Ischämie in der DMSO-Gruppe signifikant erhöht war (49 ± 8 U/L). Ebenso verhält es sich mit den AST-Aktivitäten der beiden TAA-1/DMSO Gruppen (50 ± 4 U/L bzw. 50 ± 6 U/L) vor Induktion der Ischämie – allerdings waren zu diesem Zeitpunkt auch die Aktivitäten der normoxischen Kontrolle (55 ± 3 U/L) erhöht.

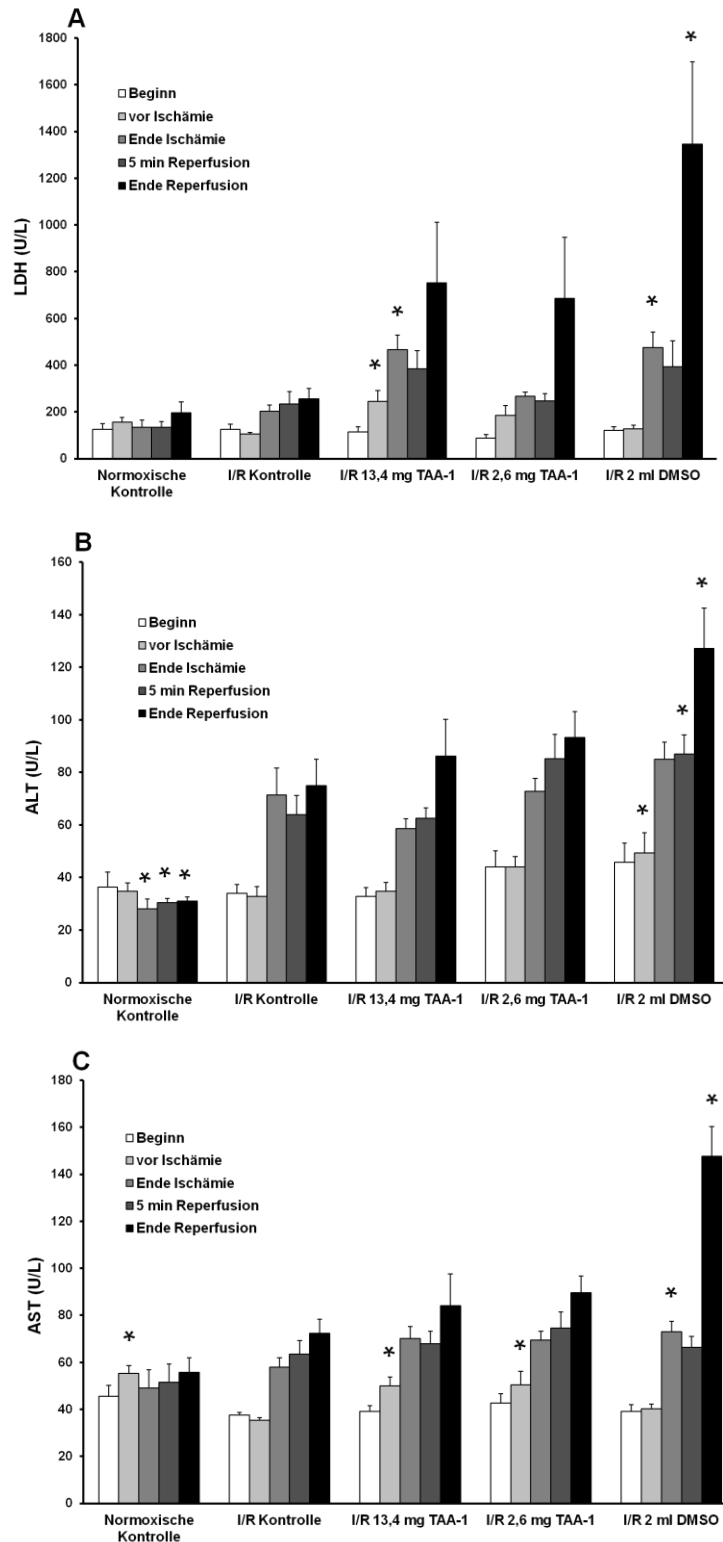


Abbildung 19: Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die Aktivitäten der Plasmaenzyme Laktatdehydrogenase (LDH, A), Alanin-Aminotransferase (ALT, B) und Aspartat-Aminotransferase (AST, C) männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der A. mesenterica superior induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuchs, vor und nach der mesenterialen Ischämie, sowie nach 5 und 120 Minuten Reperfusion. TAA-1/DMSO bzw. DMSO alleine wurden zunächst für 30 Minuten vor Induktion der Ischämie infundiert und dann wieder 30 Minuten vor Ende der Ischämie, dieses Mal für 90 Minuten (30 Minuten in der Ischämiezeit, 60 Minuten in der Reperusionszeit). In der normoxischen bzw. der I/R-Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige NaCl-Lösung mit derselben Rate infundiert (1 ml/kg x h). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.1.2 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die lokalen Schädigungsparameter des Dünndarmes

3.1.2.1 Einfluss auf den Makroscore

In der normoxischen Versuchsgruppe ergab sich bei der makroskopischen Beurteilung des Dünndarmes ein nur minimaler Schädigungsscore ($0,13 \pm 0,04$; Abbildung 20). Im Vergleich dazu zeigte der Dünndarm der I/R-Gruppen deutliche Zeichen einer Schädigung in Form von lokalen Einblutungen bis hin zu dunkelroter Verfärbung der kompletten Darmwand. Bei der I/R-Kontrollgruppe betrug der Makroscore $1,67 \pm 0,13$. Zwar war bei der 2 ml DMSO-Gruppe der Schaden tendenziell größer (Makroscore $2,08 \pm 0,22$), allerdings nicht signifikant. In der 2,6 mg TAA-1-Gruppe konnte dagegen eine signifikante Verminderung der makroskopisch erkennbaren Schädigung festgestellt werden. Hier lag der Makroscore nur bei $1,12 \pm 0,18$. Die Schädigung in der 13,4 mg TAA-1 Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der in der I/R-Kontrollgruppe (Makroscore $1,46 \pm 0,23$).

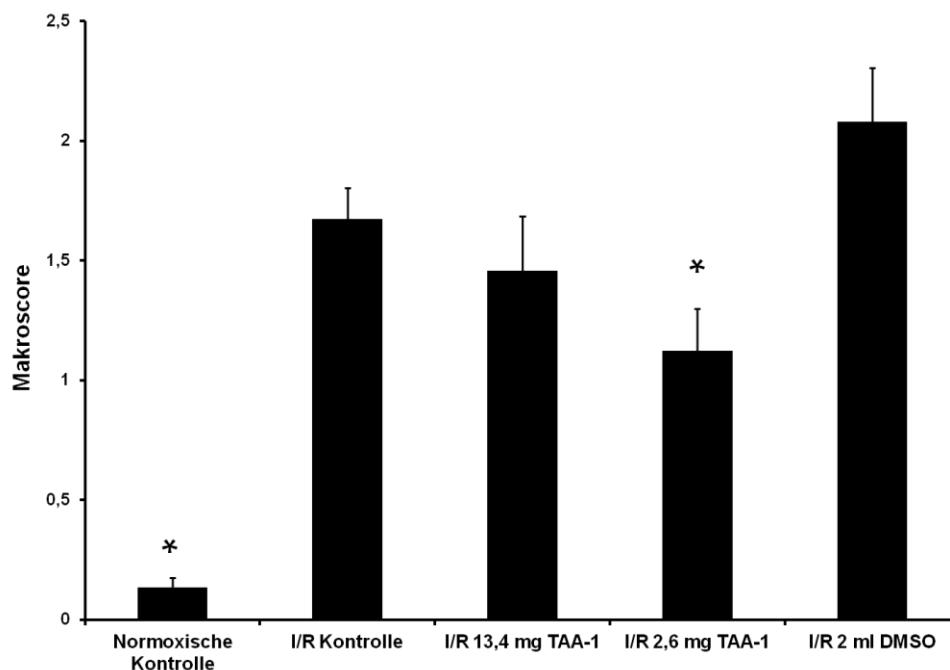


Abbildung 20: Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die makroskopische Schädigung des Dünndarms (erfasst im Makroscore) männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R; 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. TAA-1/DMSO bzw. DMSO alleine wurden zunächst für 30 Minuten vor Induktion der Ischämie infundiert und dann wieder 30 Minuten vor Ende der Ischämie, dieses Mal für 90 Minuten (30 Minuten in der Ischämiezeit, 60 Minuten in der Reperusionszeit). In der normoxischen bzw. der I/R-Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige NaCl-Lösung mit derselben Rate infundiert (1 ml/kg x h). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.1.2.2 Einfluss auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmhomogenates

Die Ergebnisse der makroskopischen Einschätzung der Schädigung spiegelten sich tendenziell auch in der Bestimmung des Hämoglobingehalts des Darmhomogenates wider (Abbildung 21). Im Homogenat der I/R-Kontrollgruppe wurde fast dreimal so viel Hämoglobin nachgewiesen wie in der normoxischen Kontrollgruppe ($0,11 \pm 0,01 \mu\text{mol/kg KG}$ vs. $0,04 \pm 0,005 \mu\text{mol/kg KG}$). In den Darmhomogenaten der 13,4 mg TAA-1- sowie der 2 ml DMSO-Gruppe fanden sich ähnliche Hämoglobinmengen ($0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol/kg KG}$) wie in der I/R-Kontrollgruppe. Geringfügig, wenn auch nicht signifikant weniger Hämoglobin im Dünndarmhomogenat wurde in der 2,6 mg TAA-1 Gruppe ermittelt ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{mol/kg KG}$).

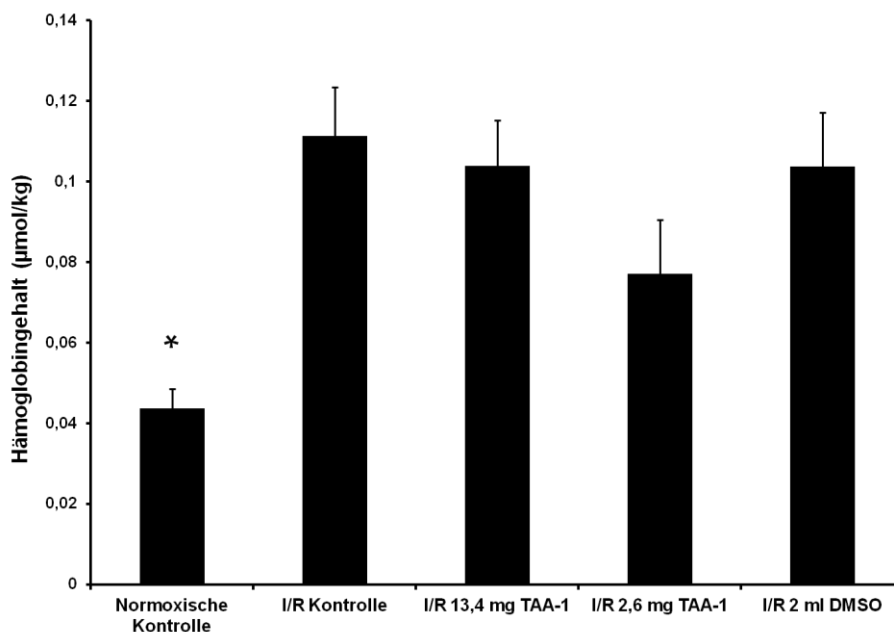


Abbildung 21: Einfluss von TAA-1 und DMSO auf den Hämoglobingehalt des Darmhomogenates männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. TAA-1/DMSO bzw. DMSO alleine wurden zunächst für 30 Minuten vor Induktion der Ischämie infundiert und dann wieder 30 Minuten vor Ende der Ischämie, dieses Mal für 90 Minuten (30 Minuten in der Ischämiezeit, 60 Minuten in der Reperusionszeit). In der normoxischen bzw. der I/R-Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige NaCl-Lösung mit derselben Rate infundiert ($1 \text{ ml/kg} \times \text{h}$). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 3 – 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.1.2.3 Einfluss auf die histologische Schädigung des Dünndarmes

Die histologische Quantifizierung der Dünndarmschädigung zeigte bei der normoxischen Kontrollgruppe erwartungsgemäß keinerlei Schädigungen an (Park-Chiu-Score $0,0 \pm 0$; Abbildung 22). Tiere der I/R-Kontrollgruppe erreichten einen Score von $1,90 \pm 0,45$. Bei allen anderen I/R-Gruppen lag der histologische Schaden über dem der I/R-Kontrollgruppe, in der 13,4 mg TAA-1- und der 2 ml DMSO-Gruppe sogar signifikant darüber (Park-Chiu-Score $4,49 \pm 0,30$ bzw. $3,72 \pm 0,61$).

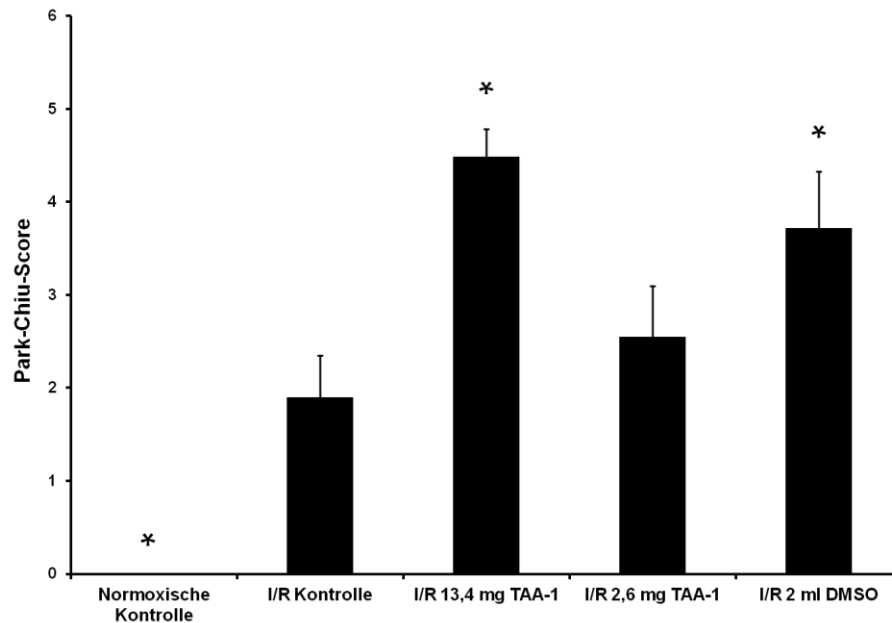


Abbildung 22: Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die histologische Schädigung (ermittelt mit Park-Chiu-Score) männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der A. mesenterica superior induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. TAA-1/DMSO bzw. DMSO alleine wurden zunächst für 30 Minuten vor Induktion der Ischämie infundiert und dann wieder 30 Minuten vor Ende der Ischämie, dieses Mal für 90 Minuten (30 Minuten in der Ischämiezeit, 60 Minuten in der Reperusionszeit). In der normoxischen bzw. der I/R-Kontrollgruppe wurde stattdessen 0,9%ige NaCl-Lösung mit derselben Rate infundiert (1 ml/kg x h). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM von 3 – 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.2 Hauptversuche

Da sich in den Vorversuchen Schwierigkeiten hinsichtlich der Applikation von TAA-1 mit DMSO (Kapitel 2.3.1.3) sowie mögliche toxische Effekte aufgrund hoher DMSO-Dosen ergeben hatten (Kapitel 3.1.1.3 und 3.1.2), wurde in den Hauptversuchen eine neue Applikation von TAA-1/DMSO und DMSO gewählt. Dabei wurden die Testsubstanzen sowie reduzierte Mengen von sowohl TAA-1 als auch DMSO nur noch einmalig 30 Minuten vor Beginn der Ischämie in die *V. cava inferior* appliziert (200 µl/kg KG in Boli von 10 µl/min).

3.2.1 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf Vitalparameter, Parameter der Blutgasanalyse und Veränderungen von Plasmaenzymaktivitäten während mesenterialer Ischämie/Reperfusion

3.2.1.1 Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) verhielt sich in der präischämischen und ischämischen Phase in allen Gruppen ähnlich wie in den Vorversuchen (Abbildung 23 A und B, Abbildung 17).

Ebenfalls ähnlich zu den Vorversuchen fiel bei allen Ischämiegruppen in der Reperfusion nach Wiedereröffnung der *A. mesenterica superior* der Blutdruck signifikant ab. Dabei zeigten sich in der I/R-Kontrollgruppe die niedrigsten Blutdruckwerte (55 – 70 mmHg). Bei beiden TAA-1-Gruppen zeigten sich ähnlich niedrige Blutdrücke wie bei den I/R-Kontrolltieren (60 - 70 mmHg; Abbildung 23 A), während die Applikation von 200 µl/kg KG DMSO den Blutdruck signifikant stabilisierte, sodass ein MAP von 75 – 85 mmHg gehalten werden konnte. Niedrigere DMSO-Dosierungen (50 µl, 10 µl/kg KG) hatten keinen signifikanten Effekt auf den MAP (MAP 65 – 70 mmHg, Abbildung 23 B). Die Blutdruckwerte der TAA-1-Gruppen und der niedrigen DMSO-Gruppen unterschieden sich weder signifikant voneinander, noch von der I/R-Kontrollgruppe.

In Übereinstimmung mit den stabilen Blutdruckwerten wurden der normoxischen Gruppe keine Flüssigkeitsboli verabreicht (Abbildung 23 C). Der 200 µl/kg KG DMSO-Gruppe wurde signifikant weniger, d.h. nur etwa die Hälfte ($1,8 \pm 0,8$ ml) der Flüssigkeitsmenge der I/R-Kontrollgruppe ($4,08 \pm 0,35$ ml) appliziert.

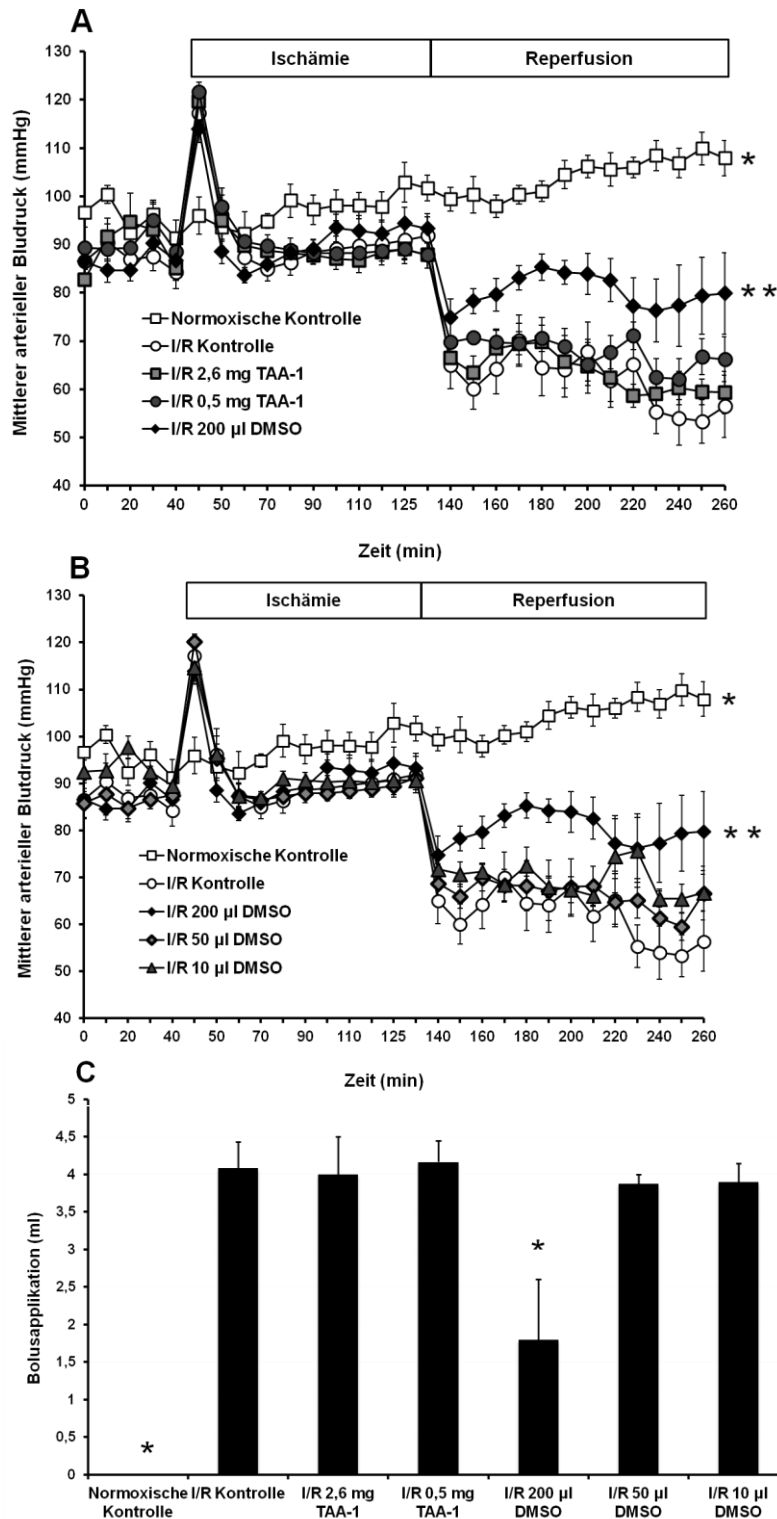


Abbildung 23: Einfluss verschiedener TAA-1- (A) und DMSO-Dosierungen (B) auf den mittleren arteriellen Blutdruck und auf die Menge der applizierten Flüssigkeitsboli (C) in Versuchen mit männlichen Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO- bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* injiziert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle während der gesamten Ischämie- und Reperusionsphase). ** $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle während der gesamten Reperusionsphase).

3.2.1.2 Einfluss auf Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körpertemperatur

Die Herzfrequenz der normoxischen Kontrollgruppentiere stieg während der Versuchsdauer leicht von 260 auf 290 Schläge/Minute an (Abbildung 24).

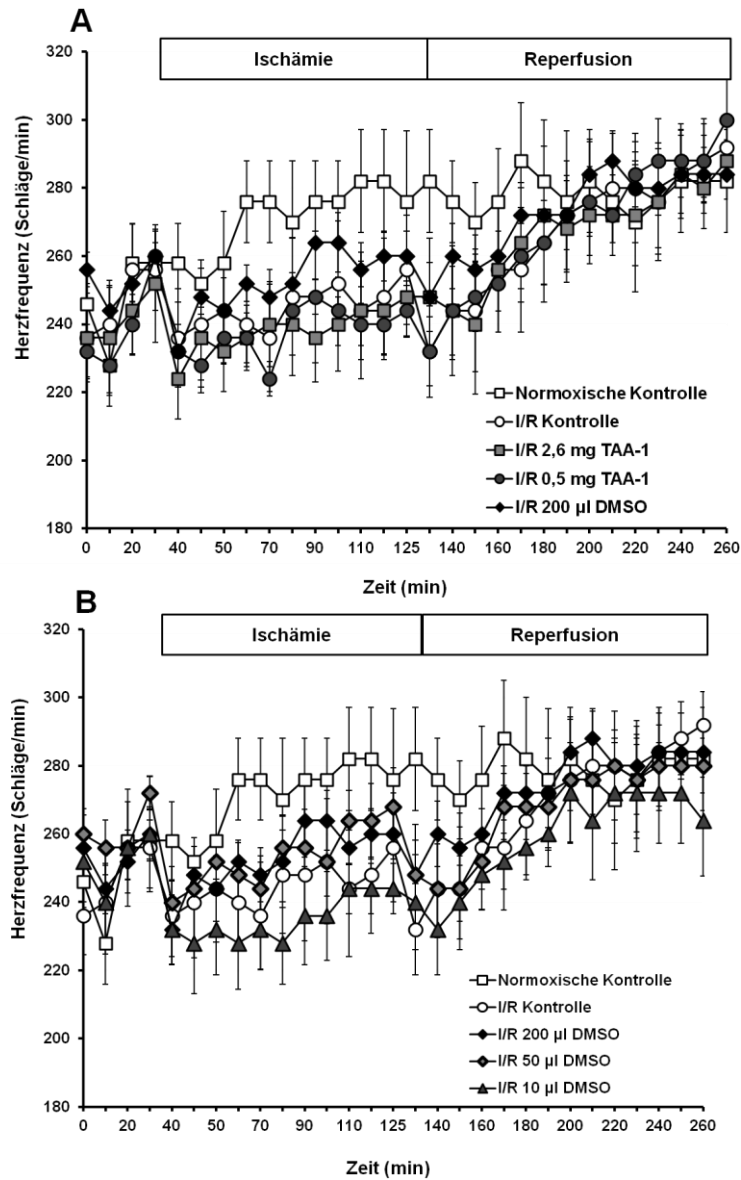


Abbildung 25: Einfluss verschiedener TAA-1- (A) und DMSO-Dosierungen (B) auf die Herzfrequenz männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO- bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

Alle I/R-Gruppen zeigten tendenziell in der Ischämiephase eine etwas geringere Herzfrequenz (225 – 250 Schläge/Minute), die sich jedoch im Verlauf der Reperfusionsphase stetig beschleunigte und am Ende des Versuchs 280 – 300 Schläge/Minute betrug. Die einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der Herzfrequenz (Abbildung 24 A und B). Während die Atemfrequenz in der normoxischen Gruppe nur leicht von 45 auf 55 Atemzüge/Minute anstieg, stieg sie in den I/R-Gruppen deutlich auf 65 – 70 Atemzüge/Minute (ohne Abbildung). Die einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich dabei untereinander nicht signifikant. Auch der Verlauf der Körpertemperatur verhielt sich wie in den Vorversuchen ähnlich bei allen Versuchsgruppen (ohne Abbildung). Im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe hatten weder TAA-1 noch DMSO einen signifikanten Effekt auf die Körpertemperatur der Tiere vor und während der mesenterialen I/R.

3.2.1.3 Einfluss auf die Parameter der Blutgasanalyse und metabolische Parameter

Laktat

Vor Induktion der Ischämie fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den arteriellen Laktatwerten der I/R-Versuchsgruppen.

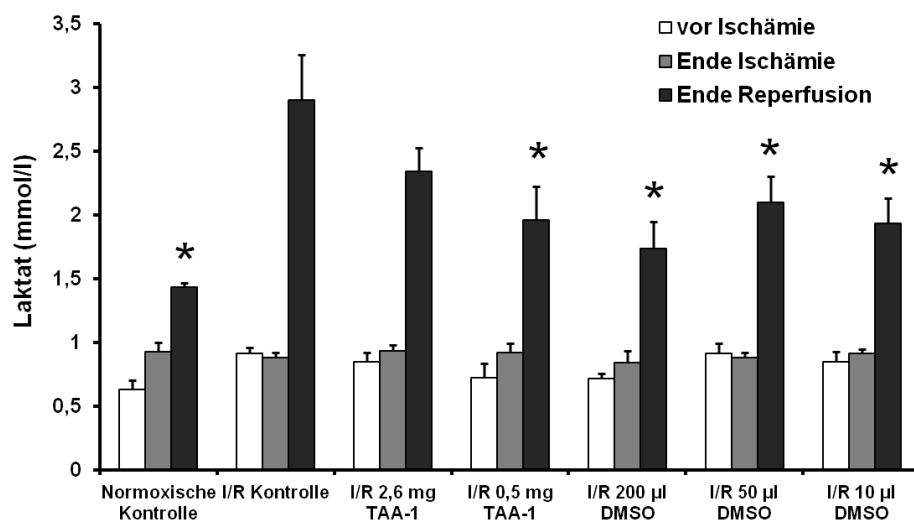


Abbildung 25: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die Laktatkonzentration im arteriellen Blut männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO- bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

In der ischämischen Phase kam es in keiner Gruppe zu einem signifikanten Laktatanstieg (Abbildung 25). Nach Beginn der Reperfusion stiegen die Laktatwerte jedoch deutlich bei allen Tieren der I/R-Gruppen an. Auch in der normoxischen Gruppe stieg das Laktat an, allerdings signifikant weniger (von $0,63 \pm 0,07$ mmol/L auf $1,43 \pm 0,03$ mmol/L). Der größte Anstieg war in der I/R-Kontrollgruppe zu verzeichnen ($2,9 \pm 0,36$ mmol/L am Ende der Reperfusion). Bei allen Versuchsgruppen außer der 2,6 mg TAA-1 Gruppe war der Laktatanstieg signifikant geringer (0,5 mg TAA-1: $1,96 \pm 0,36$ mmol/L; 200 µl DMSO: $1,74 \pm 0,21$ mmol/L; 50 µl DMSO: $2,1 \pm 0,2$ mmol/L; 10 µl DMSO: $1,93 \pm 0,20$ mmol/L).

Base Excess

Vor der Ischämie ließ sich beim Base Excess (BE) kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen beobachten.

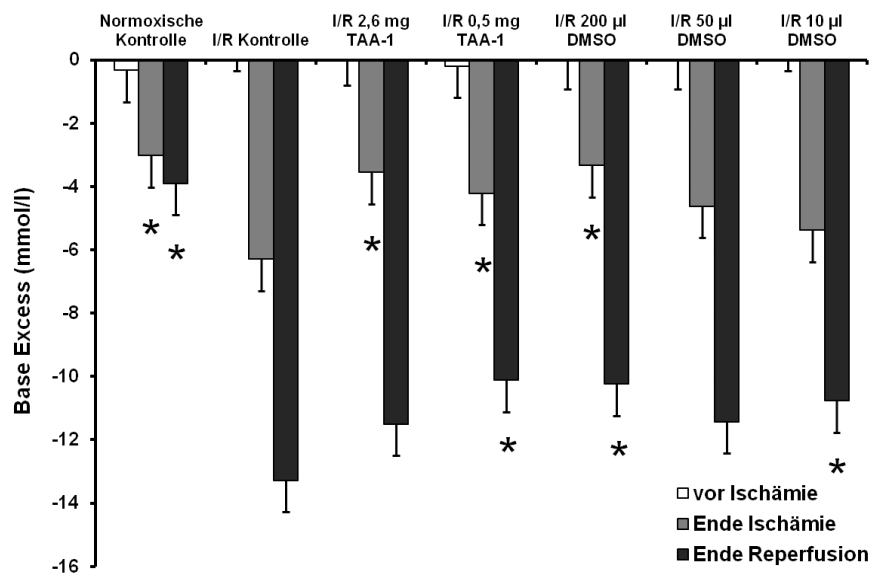


Abbildung 26: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf den Base Excess im arteriellen Blut männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuchs, vor und nach der mesenterialen Ischämie, sowie nach 5 und 120 Minuten Reperfusion. Die verschiedenen TAA-1/DMSO- bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

In der normoxischen Gruppe sank der BE ausgehend von $-0,33 \pm 0,09$ mmol/L auf maximal $-3,9 \pm 0,78$ mmol/L am Ende der Reperfusion (Abbildung 26). Im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe mit einem BE von $-6,3 \pm 0,24$ mmol/L am Ende der Ischämie, wiesen beide TAA-1-Gruppen und die 200 µl DMSO-Gruppe einen signifikant positiveren BE auf

(2,6 mg TAA-1: $-3,55 \pm 0,34$ mmol/L; 0,5 mg TAA-1: $-4,22 \pm 0,43$ mmol/L; 200 μ l DMSO: $-3,34 \pm 0,19$ mmol/L). Am Ende der Reperfusion zeigten alle Testgruppen einen positiveren BE als die I/R-Kontrollgruppe ($-13,28 \pm 1,05$ mmol/L), wobei in den Gruppen 0,5 mg TAA-1, 200 μ l DMSO und 10 μ l DMSO dieser Unterschied signifikant war ($-10,12 \pm 0,66$ mmol/L bzw. $-10,24 \pm 0,97$ mmol/L bzw. $-10,77 \pm 0,85$ mmol/L).

pH-Wert

Alle Versuchsgruppen starteten in den Versuchsablauf mit einem nicht signifikant unterschiedlichen pH-Wert zwischen 7,32 und 7,35 (Abbildung 27).

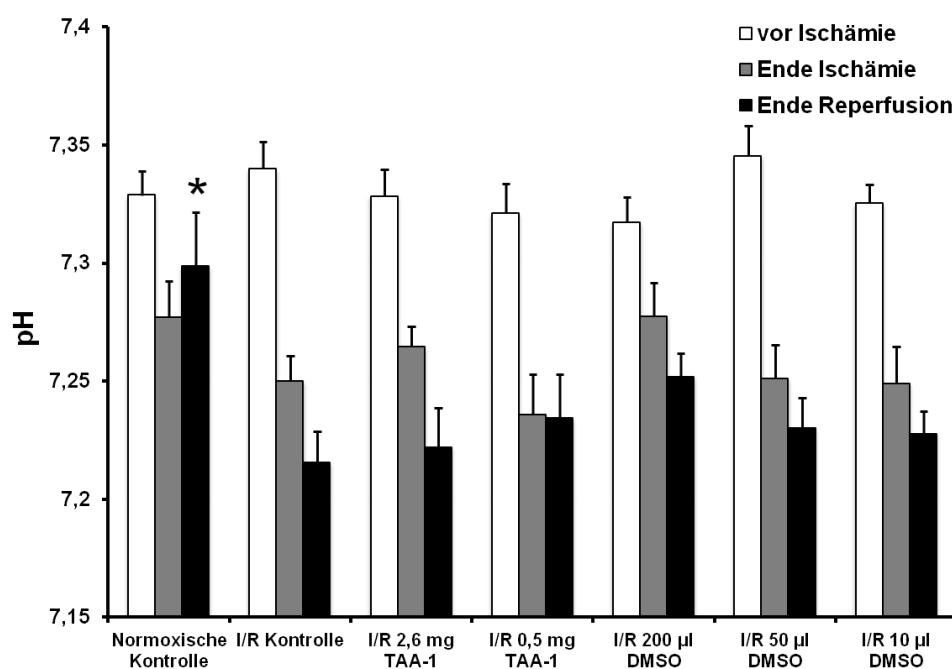


Abbildung 27: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf den pH-Wert im arteriellen Blut männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuchs, vor und nach der mesenterialen Ischämie, sowie nach 5 und 120 Minuten Reperfusion. Die verschiedenen TAA-1/DMSO- bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 μ l/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 μ l/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

In der normoxischen Gruppe zeigte sich ein leichter pH-Abfall nach der Eröffnung der Bauchhöhle und der Gefäßpräparation (pH $7,28 \pm 0,02$); zum Ende der Reperfusion erholten sich die Tiere jedoch auf einen pH-Wert von $7,30 \pm 0,02$. Dagegen konnte in allen anderen Testgruppen ein stetiger Abfall des pH-Wertes über die Ischämie- und Reperfusionsphase beobachtet werden, sodass der arterielle Blut-pH-Wert der I/R-

Kontrolltiere am Ende nur noch $7,22 \pm 0,01$ betrug. Alle anderen Gruppen zeigten nur tendenziell höhere pH-Werte als die I/R-Kontrollgruppe; in der 200 μ l DMSO-Gruppe blieb der pH-Wert am Ende der Reperfusion mit $7,27 \pm 0,27$ am höchsten unter den I/R-Gruppen.

pCO₂

Die ermittelten arteriellen CO₂-Partialdruck(pCO₂)-Werte in allen I/R-Gruppen stiegen im Versuchsverlauf nicht an, sondern fielen von ca. 50 mmHg zu Beginn des Versuches auf etwa 35 mmHg am Ende der Reperfusion ab (Abbildung 28). Weder TAA-1 noch DMSO hatten einen signifikanten Effekt auf den Verlauf der pCO₂-Werte. Die normoxische Kontrollgruppe wies diesen Abfall des pCO₂ nicht auf.

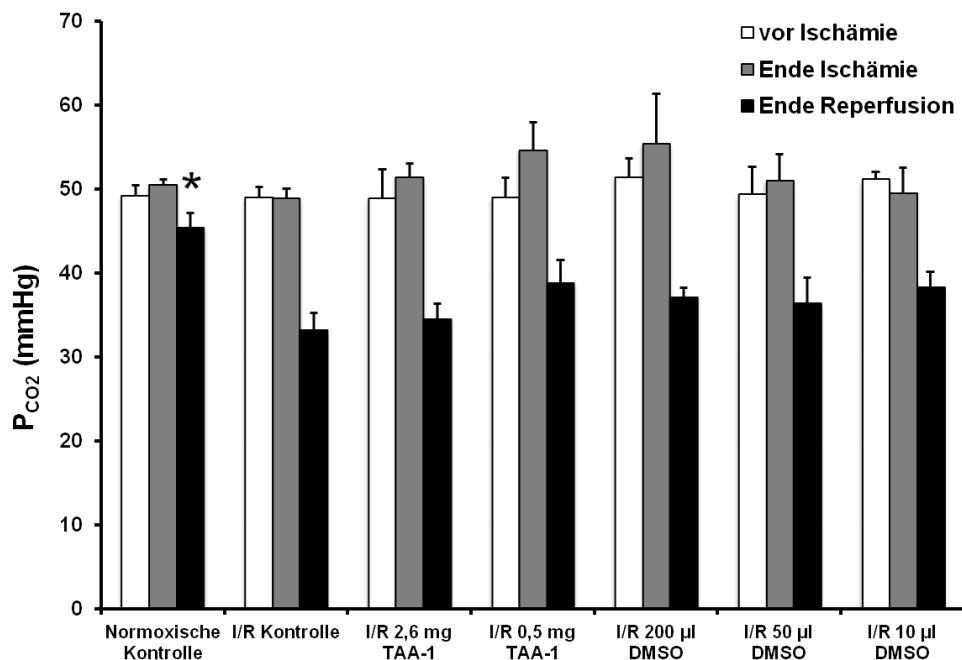


Abbildung 28: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf den pCO₂ (in mmHg) im arteriellen Blut männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuchs, vor und nach der mesenterialen Ischämie, sowie nach 5 und 120 Minuten Reperfusion. Die verschiedenen TAA-1/DMSO- bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 μ l/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 μ l/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

Übrige Parameter der Blutgasanalyse

Sowohl die normoxische Kontrolle, als auch die beiden TAA-1-Gruppen sowie die 200 µl DMSO-Gruppe wiesen am Ende der Ischämie einen signifikant höheren Sauerstoffpartialdruck (pO_2)-Wert im arteriellen Blut (Normoxische Kontrolle: 454 ± 21 mmHg; 2,6 mg TAA-1: 472 ± 9 mmHg; 0,5 mg TAA-1: 460 ± 24 ; 200 µl DMSO: 445 ± 22 mmHg; Tabelle 3) im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe auf (335 ± 40 mmHg). Dieser Trend zeigte sich bei der 0,5 mg TAA-1 und der 200 µl DMSO-Gruppe auch in der peripheren Sauerstoffsättigung (SO_2) am Ende der Ischämie. Am Ende der Reperfusion fanden sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

In der normoxischen Kontrollgruppe fanden sich signifikant höhere Bikarbonatkonzentrationen als bei der I/R-Kontrollgruppe (Zeitpunkt am Ende der Ischämie $21,3 \pm 0,9$ vs $18,8 \pm 0,1$; Zeitpunkt am Ende der Reperfusion $20,9 \pm 0,7$ mmol/L vs $14,7 \pm 0,6$ mmol/L). Auch die 2,6 mg TAA-1- sowie die 200 µl DMSO-Gruppe wiesen am Ende der Ischämie signifikant stabilere Bikarbonatwerte auf (2,6 mg TAA-1: $20,7 \pm 0,2$ mmol/L; 200 µl DMSO: $21 \pm 0,2$ mmol/L). Am Ende der Reperfusion unterschieden sich die I/R-Versuchsgruppen nicht mehr signifikant voneinander (Tabelle 3).

Am Ende der Reperfusion kam es in allen I/R-Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Hämoglobinwerte (ctHb; mg/dL) im Sinne einer Hämokonzentration. Dabei wiesen jedoch beide TAA-1-Gruppen, alle DMSO-Gruppen und die normoxische Kontrolle einen signifikant niedrigeren Hämoglobinwert am Ende der Reperfusion im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe auf (Normoxische Kontrollgruppe: $12,23 \pm 0,22$ g/dL; I/R-Kontrollgruppe: $16,4 \pm 0,5$ g/dL; Tabelle 3).

Außerdem kam es bei allen I/R-Gruppen im Versuchsverlauf zu einer Erhöhung des Serumkaliums (K^+ ; mmol/L; Tabelle 3). Die normoxische Kontrollgruppe wies demgegenüber signifikant niedrigere Kaliumwerte auf ($4,8 \pm 0,03$ mmol/L im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe von $5,6 \pm 0,3$ mmol/L). Die einzelnen I/R-Versuchsgruppen unterschieden sich am Ende der Reperfusion nicht signifikant voneinander.

Am Ende der Ischämie wies einzig die 2,6 mg TAA-1-Gruppe eine sehr leicht aber signifikant erhöhte Osmolalität im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe auf ($291,63 \pm 1,00$ mmol/kg im Vergleich zu $288,24 \pm 1,46$ mmol/kg).

Die Parameter Natrium (Na^+), Kalzium (Ca^{2+}), Chlorid (Cl^-) und Glucose (Glu) wurden weder durch die mesenteriale Ischämie/Reperfusion noch durch TAA-1 und DMSO signifikant beeinflusst (Tabelle 3).

Parameter	Zeitpunkt	normoxische	I/R Kontrolle	I/R 2,6 mg	I/R 0,5 mg	I/R 200 µl	I/R 50 µl	I/R 10 µl
	Blutabnahme	Kontrolle		TAA-1	TAA-1	DMSO	DMSO	DMSO
pO₂ (mmHg)	1 (vor I)	506,25 ± 13,46	487,33 ± 28,52	506,33 ± 9,19	501,33 ± 22,41	474,2 ± 10,78	515,33 ± 10,01	520,67 ± 12,91
	2 (Ende I)	454,75 ± 20,83 *	334,5 ± 39,38	471,5 ± 8,82 *	459,83 ± 23,64 *	444,6 ± 21,65 *	390,8 ± 51,89	396,33 ± 22,77
	3 (Ende R)	460,33 ± 5,11	495,4 ± 14,50	489,83 ± 21,28	490,17 ± 18,56	490,33 ± 18,87	464,17 ± 24,72	461 ± 17,79
sO₂ (%)	1 (vor I)	97,38 ± 0,19	97,37 ± 0,15	97,33 ± 0,14	97,4 ± 0,12	97,26 ± 0,06	97,38 ± 0,08	97,27 ± 0,09
	2 (Ende I)	97,25 ± 0,19	96,82 ± 0,09	97,18 ± 0,08	97,37 ± 0,08 *	97,28 ± 0,15 *	96,92 ± 0,26	97,02 ± 0,08
	3 (Ende R)	97,33 ± 0,09	97,3 ± 0,06	97,27 ± 0,09	97,25 ± 0,09	97,18 ± 0,08	97,13 ± 0,10	97,13 ± 0,06
HCO₃⁻ (mmol/L)	1 (vor I)	23,75 ± 0,26	24,28 ± 0,69	24,14 ± 0,45	23,38 ± 0,13	23,72 ± 0,25	23,7 ± 0,22	24,22 ± 0,38
	2 (Ende I)	21,3 ± 0,88 *	18,77 ± 0,09	20,68 ± 0,24 *	20,03 ± 0,31	20,95 ± 0,20 *	19,92 ± 0,48	19,33 ± 0,36
	3 (Ende R)	20,87 ± 0,71 *	14,72 ± 0,6	14,78 ± 0,73	16,22 ± 0,38	16,36 ± 0,66	15,4 ± 0,32	15,8 ± 0,54
ctHb (g/dL)	1 (vor I)	13 ± 0,1	12,45 ± 1,45	13,12 ± 0,35	12,75 ± 0,36 *	12,94 ± 0,50	12,8 ± 0,23 *	13,3 ± 0,20
	2 (Ende I)	13,1 ± 0,34	13,42 ± 0,64	13,75 ± 0,22	13,37 ± 0,23	12,98 ± 0,36	12,8 ± 0,29	13,22 ± 0,54
	3 (Ende R)	12,23 ± 0,22 *	16,44 ± 0,45	15,17 ± 0,54 *	15,04 ± 0,25 *	14,5 ± 0,46 *	14,95 ± 0,23 *	14,93 ± 0,35 *
Na⁺ (mmol/L)	1 (vor I)	138,25 ± 0,48	138,67 ± 0,99	139,33 ± 0,61	139,67 ± 0,76	139 ± 0,82	140 ± 0,37	139,17 ± 0,48
	2 (Ende I)	137,75 ± 0,63	138,4 ± 0,94	139,5 ± 0,56	139 ± 0,97	139 ± 0,29	139,8 ± 0,34	139 ± 0,77
	3 (Ende R)	139,67 ± 0,29	139 ± 1,75	138,5 ± 0,56	139,33 ± 0,71	139,5 ± 0,62	138,5 ± 0,56	137,5 ± 0,85
K⁺ (mmol/L)	1 (vor I)	4,53 ± 0,10	4,33 ± 0,12	4,28 ± 0,18	4,38 ± 0,17	4,5 ± 0,09	4,25 ± 0,08	4,43 ± 0,11
	2 (Ende I)	5,13 ± 0,13	5,12 ± 0,2	5,12 ± 0,14	5,43 ± 0,15	5,34 ± 0,24	4,92 ± 0,17	4,98 ± 0,23
	3 (Ende R)	4,77 ± 0,03 *	5,63 ± 0,33	5,53 ± 0,19	5,57 ± 0,18	5,4 ± 0,19	5,48 ± 0,09	5,52 ± 0,06

Parameter	Zeitpunkt	normoxische	I/R Kontrolle	I/R 2,6 mg	I/R 0,5 mg	I/R 200 µl	I/R 50 µl	I/R 10 µl
	Blutabnahme	Kontrolle		TAA-1	TAA-1	DMSO	DMSO	DMSO
Ca²⁺ (mmol/L)	1 (vor I)	1,45 ± 0,01	1,40 ± 0,03	1,41 ± 0,04	1,49 ± 0,02	1,45 ± 0,02	1,39 ± 0,04	1,36 ± 0,04
	2 (Ende I)	1,47 ± 0,03	1,41 ± 0,05	1,44 ± 0,03	1,46 ± 0,02	1,47 ± 0,04	1,43 ± 0,04	1,38 ± 0,04
	3 (Ende R)	1,47 ± 0,04	1,57 ± 0,07	1,45 ± 0,03	1,43 ± 0,03 *	1,47 ± 0,04	1,48 ± 0,05	1,47 ± 0,05
Cl⁻ (mmol/L)	1 (vor I)	108,5 ± 0,29	109 ± 2,31	107,83 ± 0,68	109,67 ± 1,26	109,5 ± 0,56	108,67 ± 0,76	106,5 ± 0,76
	2 (Ende I)	112 ± 1,68	115 ± 1,26	112,67 ± 1,15	113 ± 1	113 ± 1,35	115 ± 1,08	114,67 ± 1,20
	3 (Ende R)	114,33 ± 1,26 *	119,67 ± 0,99	118,83 ± 0,65	120 ± 0,93	117,83 ± 1,25	119,83 ± 0,91	118,17 ± 1,33
Glu (mg/dL)	1 (vor I)	185,25 ± 9,52	183,83 ± 12,69	182,83 ± 10,45	173,17 ± 11,18	179,17 ± 9,85	172,17 ± 8,39	173,33 ± 8,41
	2 (Ende I)	224,25 ± 24,28	215,5 ± 20,45	233,17 ± 14,61	220,83 ± 23,11	225 ± 21,87	200,33 ± 11,51	212,5 ± 8,33
	3 (Ende R)	206,75 ± 10,91	210,17 ± 48,40	197,67 ± 25,75	178 ± 36,61	209,83 ± 35,85	232,33 ± 49,98	268,5 ± 59,55
mOsm (mmol/kg)	1 (vor I)	286,98 ± 0,55	287,72 ± 1,67	289,05 ± 1,08	289,08 ± 1,04	288,44 ± 1,07	289,42 ± 0,88	287,87 ± 0,44
	2 (Ende I)	288,18 ± 0,73	288,24 ± 1,46	291,63 ± 1,00 *	290,43 ± 0,99	290,78 ± 0,72	290,98 ± 1,09	289,78 ± 1,34
	3 (Ende R)	290 ± 0,53	289,65 ± 1,99	288,12 ± 1,65	288,45 ± 1,43	290,73 ± 1,01	290,28 ± 1,80	290,18 ± 2,28

Tabelle 3: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die Parameter der Blutgasanalyse Sauerstoffpartialdruck pO₂, Sauerstoffsättigung sO₂, Bikarbonatkonzentration HCO₃⁻, Hämoglobinkonzentration ctHb, Elektrolyte: Natrium Na⁺, Kalium K⁺, Kalzium Ca²⁺, Chlorid Cl⁻, Glukose Glu und Osmolalität mOsm wurden im Blut männlicher Wistar-Ratten vor und während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion bestimmt. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuchs, vor und nach der mesenterialen Ischämie, sowie nach 5 und 120 Minuten Reperfusion. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM von 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.2.1.4 Einfluss auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blutplasma

Der mesenteriale Ischämie-/Reperfusionsschaden verursachte bei allen Tieren einen Anstieg in den drei gemessenen Plasmaenzymaktivitäten im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (Abbildung 29).

Während die LDH-Werte in der I/R-Kontrollgruppe stetig im Versuchsverlauf anstiegen (von $108,13 \pm 15,45$ U/L auf $346,92 \pm 75,15$ U/L am Ende der Reperfusion, Abbildung 29 A), zeigte sich in den anderen Versuchsgruppen ein sehr inhomogenes Bild: Bei beiden TAA-1-Gruppen sowie auch in der 200 µl DMSO-Gruppe kam es verglichen mit der I/R-Kontrollgruppe schon vor Induktion der Ischämie zu deutlich erhöhten LDH-Werten (z.B. 0,5 mg TAA: $476,92 \pm 24,54$ U/L). Zwischenzeitlich stiegen die LDH-Werte am Ende der Ischämie auf noch höhere Werte von $787,82 \pm 105,96$ U/L (2,6 mg TAA-1) an. Am Ende der Reperfusion fielen die LDH-Werte dagegen wieder geringfügig ab, sodass kein signifikanter Unterschied zur I/R-Kontrollgruppe mehr vorhanden war. Bei den niedrigeren DMSO-Dosierungen (50 µl und 10 µl) kam es im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe zu keinen signifikanten LDH-Wert-Erhöhungen oder -Erniedrigungen.

Bei den Plasmaenzymaktivitäten der AST und ALT kam es in der I/R-Kontrollgruppe im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe im Verlauf der Ischämie und der Reperfusion zu einem Anstieg der Werte (Abbildung 29 B und C). Dieser Verlauf der Plasma-AST bzw. ALT-Aktivitäten infolge der mesenterialen I/R wurde weder durch die verschiedenen TAA-1 - noch durch die DMSO-Dosen signifikant beeinflusst.

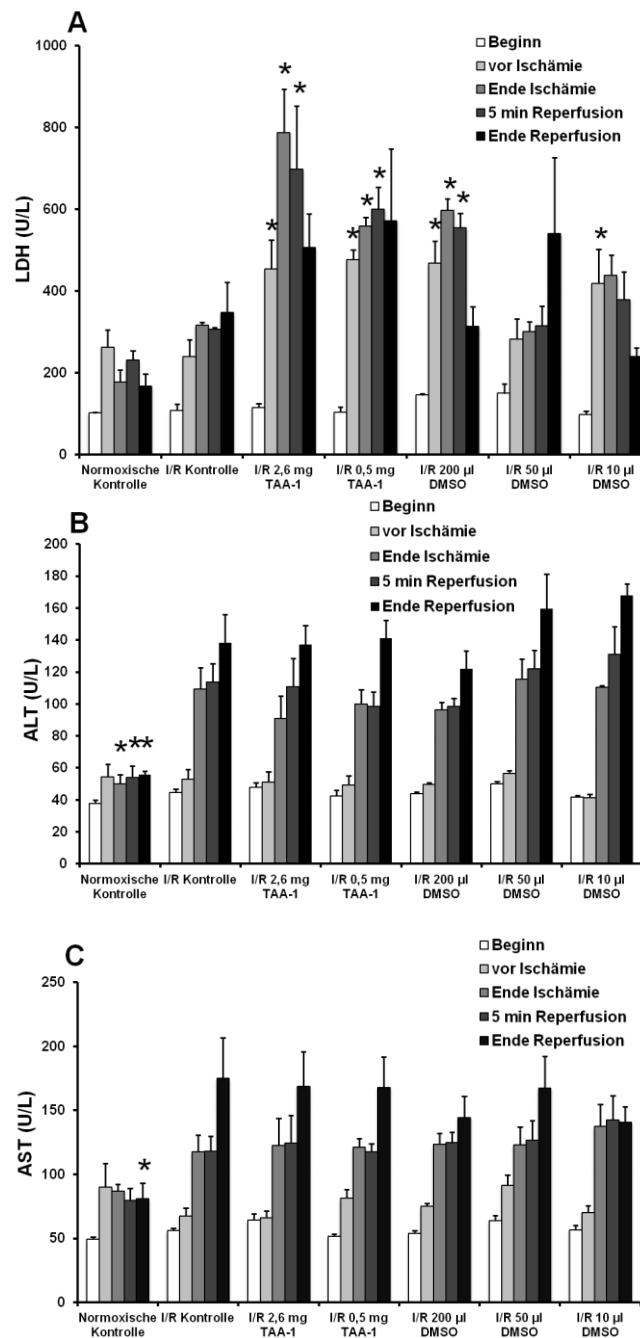


Abbildung 29: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die Aktivitäten der Plasmaenzyme Laktatdehydrogenase (LDH, A), Alanin-Aminotransferase (ALT, B) und Aspartat-Aminotransferase (AST, C) männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuchs, vor und nach der mesenterialen Ischämie, sowie nach 5 und 120 Minuten Reperfusion. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.2.2 Einfluss von TAA-1 und DMSO auf die lokalen Schädigungsparameter des Dünndarmes

3.2.2.1 Einfluss auf die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Dünndarmgewebe

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Dünndarm der Tiere aus der I/R-Kontrollgruppe war dreimal höher ($300,19 \pm 20,12$ Neutrophile/mm²) als im Dünndarm der normoxischen Kontrollgruppe ($103,02 \pm 10,26$ Neutrophile/mm²; Abbildung 30). Nur die Applikation von 200 µl DMSO/kg KG verringerte im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe die Einwanderung der Leukozyten auf etwa $182,77 \pm 31,31$ Neutrophile/mm² signifikant.

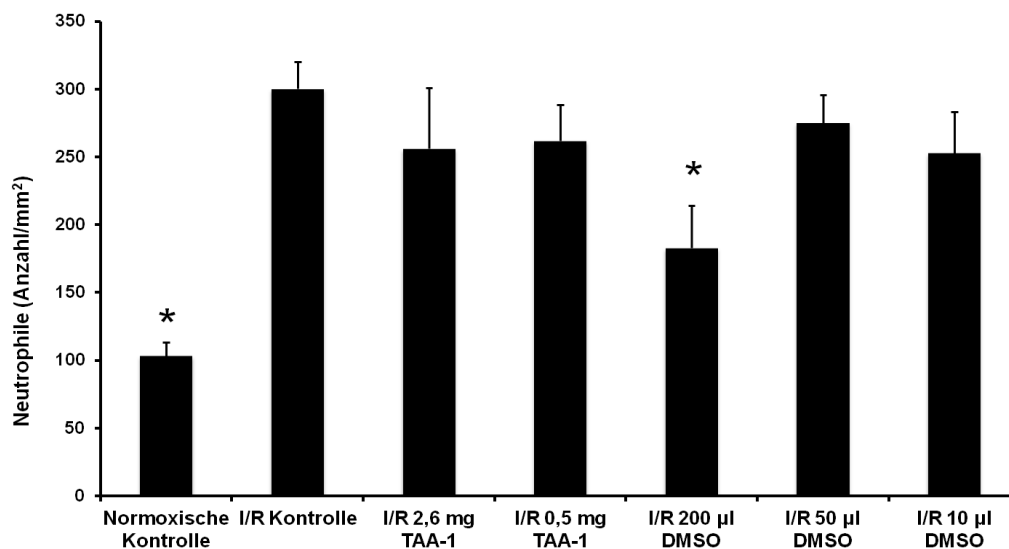


Abbildung 30: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die Anzahl der in den Darm eingewanderten neutrophilen Granulozyten pro Dünndarmfläche männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.2.2.2 Einfluss auf die Bildung von TBARS im Dünndarmgewebe

Bei der Messung der TBARS zur Quantifizierung der Lipidperoxidation (Kapitel 2.3.2.3.3) kam es infolge der mesenterialen I/R zu fast dreimal höheren Werten in der I/R-Kontrollgruppe ($0,166 \pm 0,01$ µmol/kg) im Vergleich zum ungeschädigten normoxischen Darm ($0,057 \pm 0,00$ µmol/kg; Abbildung 31). Beide TAA-1-Dosierungen – im Gegensatz zu den verschiedenen DMSO-Dosierungen – verringerten die TBARS-Bildung, wobei dieser Effekt nur in der 0,5 mg TAA-1-Gruppe signifikant war ($0,13 \pm 0,01$ µmol/kg).

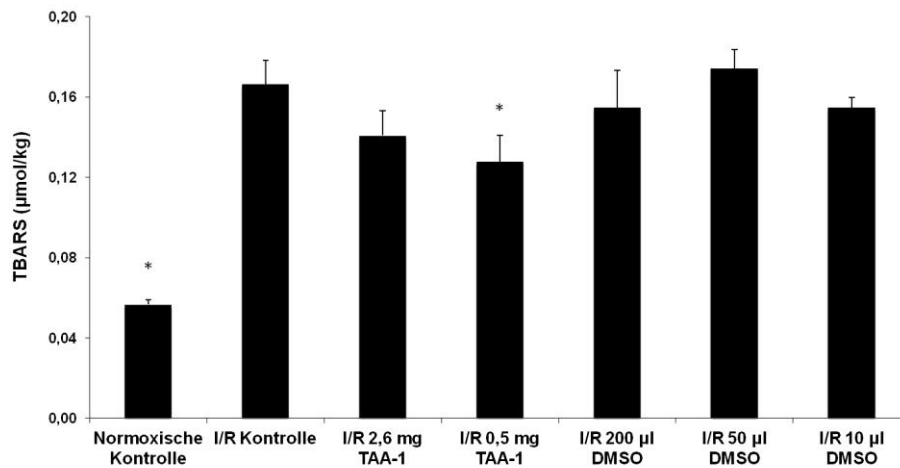


Abbildung 31: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen im Dünndarmgewebe männlicher Wistar-Ratten (TBARS in $\mu\text{mol/kg}$) während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 $\mu\text{l/kg}$ KG verteilt auf Boli von ca. 10 $\mu\text{l/min}$). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

3.2.2.3 Einfluss auf den Hämoglobingehalt des Dünndarmhomogenates

Der Hämoglobingehalt des Darmhomogenates ähnelte den Ergebnissen des Makroscores (Kapitel 3.2.2.4): der höchste Hämoglobingehalt wurde im Darmgewebe der I/R-Kontrolltiere gefunden ($0,125 \pm 0,009 \mu\text{mol/kg}$; Abbildung 32), was in etwa dem doppelten Hämoglobingehalt des normoxischen Dünndarmes entsprach ($0,065 \pm 0,008 \mu\text{mol/kg}$).

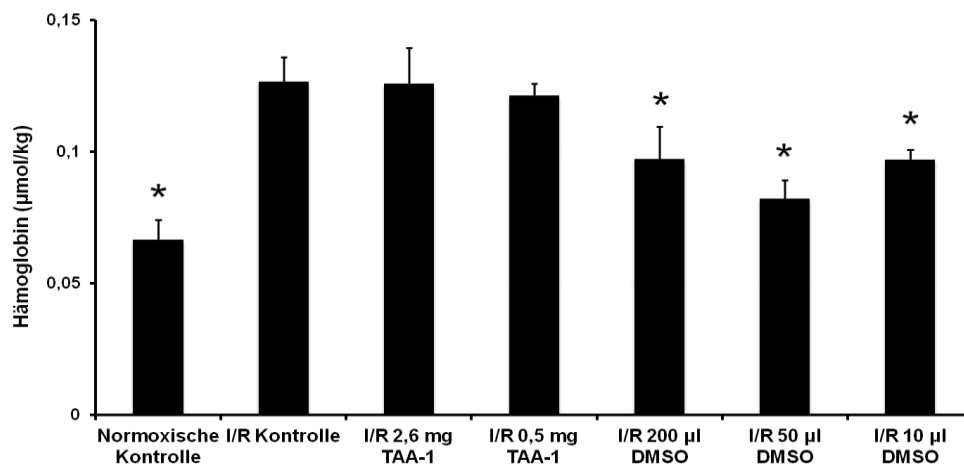


Abbildung 32: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf den Hämoglobingehalt des Darmhomogenates männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 $\mu\text{l/kg}$ KG verteilt auf Boli von ca. 10 $\mu\text{l/min}$). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle).

TAA-1 hatte keinen Effekt auf die Gewebehämoglobinkonzentration. Alle DMSO-Gruppen wiesen dagegen signifikant weniger Hämoglobin im Darm auf (200 µl DMSO-Gruppe: $0,079 \pm 0,001$ µmol/kg; 50 µl DMSO-Gruppe: $0,078 \pm 0,002$ µmol/kg; 10 µl DMSO-Gruppe: $0,075 \pm 0,004$ µmol/kg).

3.2.2.4 Einfluss auf den Makroscore

Bei der makroskopischen Untersuchung der resezierten Darmstücke ergaben sich analog zu den Vorversuchen keine Anzeichen für Einblutungen in der normoxischen Gruppe (Makroscore $0,04 \pm 0,00$; Abbildung 33), wohingegen zum Teil massive Schädigungen wie komplett dunkelrote Verfärbung der Wand des Dünndarms der I/R-Kontrolltiere sichtbar wurden (Makroscore $1,77 \pm 0,25$).

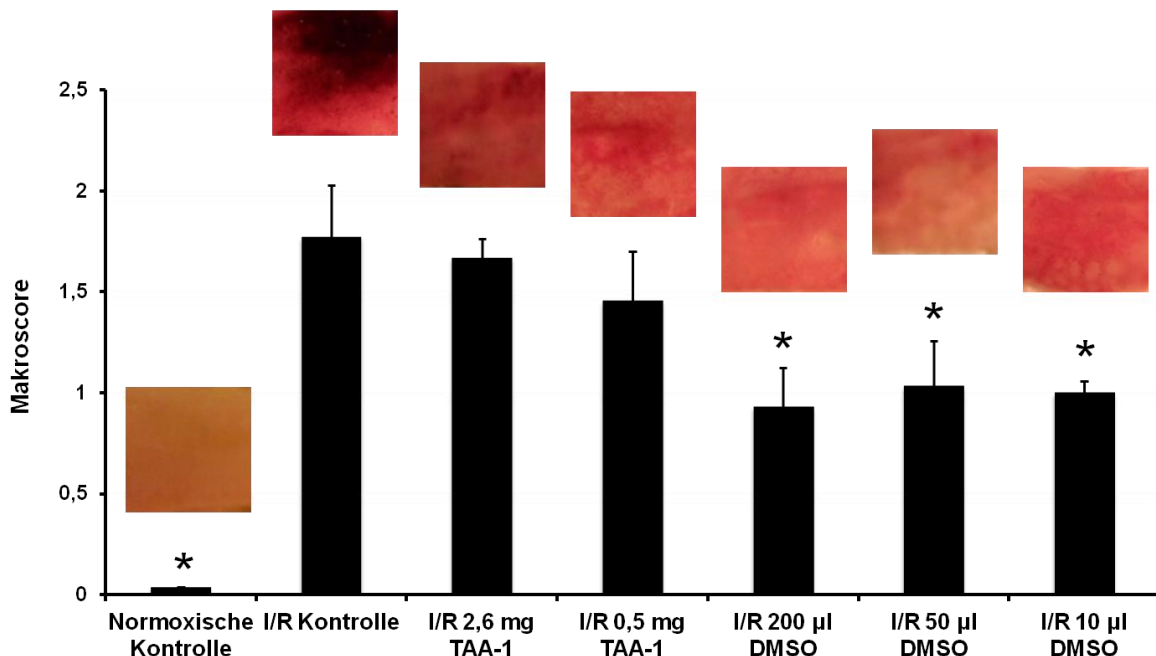


Abbildung 33: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die makroskopische Schädigung des Dünndarms männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 µl/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 µl/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle). Die jeweiligen Bilder zeigen beispielhafte Zustände der geschädigten Darmabschnitte in den einzelnen Gruppen, die Bilder entsprechen nicht dem gemittelten Makroscore-Wert.

Während sich bei beiden TAA-1 Gruppen keine signifikanten Unterschiede zur I/R-Kontrollgruppe feststellen ließen, wurden bei allen DMSO-Gruppen makroskopisch signifikant weniger flächige dunkelrote Einblutungen nachgewiesen (200 µl DMSO-

Gruppe: $0,93 \pm 0,19$; 50 μ l DMSO-Gruppe: $1,03 \pm 0,23$; 10 μ l DMSO-Gruppe: $1,00 \pm 0,06$).

3.2.2.5 Einfluss auf die histologische Schädigung des Dünndarmes

Bei der histologischen Bewertung des Darmes ergab sich auch in den Hauptversuchen ein nur minimaler Schädigungsscore für die normoxische Kontrollgruppe (Park-Chiu-Score $0,13 \pm 0,05$; Abbildung 34). Die größte histologische Schädigung fand sich in der I/R-Kontrollgruppe mit einem gegenüber der normoxischen Gruppe signifikant erhöhten Park-Chiu-Score von $3,84 \pm 0,32$. Nur in der 10 μ l DMSO-Gruppe war die histologische Schädigung signifikant geringer (Park-Chiu-Score $2,30 \pm 0,28$). Bei allen anderen Testgruppen zeigte sich zwar eine Tendenz zur Verringerung der Schädigung, jedoch keinerlei Signifikanz.

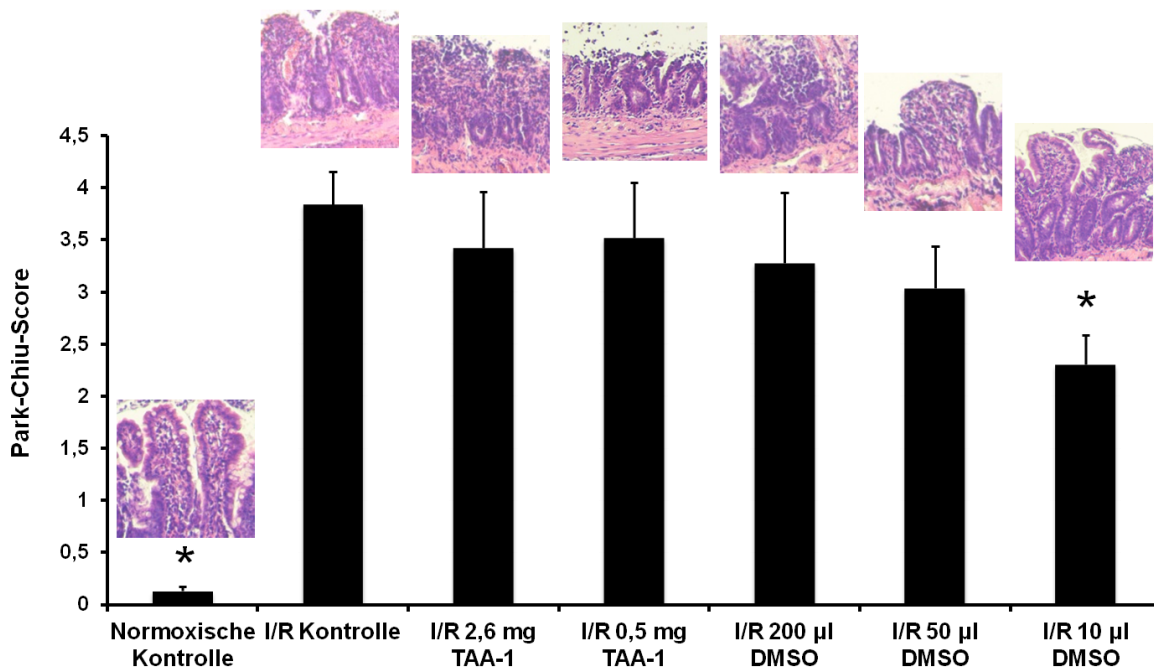


Abbildung 34: Einfluss verschiedener TAA-1- und DMSO-Dosierungen auf die histologische Dünndarmschädigung (ermittelt mittels Park-Chiu-Score) männlicher Wistar-Ratten während der mesenterialen Ischämie/Reperfusion. Die mesenteriale Ischämie (I; 90 min) wurde durch Okklusion der *A. mesenterica superior* induziert, die Reperfusion (R, 120 min) durch Öffnen der Gefäßklemme eingeleitet. Die verschiedenen TAA-1/DMSO bzw. DMSO-Dosierungen (pro kg KG) wurden einmalig 30 Minuten vor Induktion der Ischämie per Bolusapplikation über zehn Minuten in die *V. cava inferior* infundiert (200 μ l/kg KG verteilt auf Boli von ca. 10 μ l/min). Die normoxische und die I/R-Kontrollgruppe erhielten stattdessen das gleiche Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (im Vergleich zur I/R Kontrolle). Die jeweiligen Bilder zeigen beispielhafte Zustände der geschädigten Darmabschnitte in den einzelnen Gruppen, die Bilder entsprechen nicht den gemittelten Park-Chiu-Score-Werten.

4. Diskussion

4.1 Vorversuche und erforderliche methodische Modifikationen

Beim ersten *in vivo*-Einsatz des Katalasemimetikum-Prodrugs TAA-1 im Modell zur mesenterialen Ischämie/Reperfusion ergaben sich in Vorversuchen protektive Effekte durch eine Dosis von 2,6 mg TAA-1/ 2 ml DMSO/ kg KG. Neben einer tendenziell verbesserten Hämodynamik in Form eines höheren Blutdruckes während der Reperfusionsphase (Kapitel 3.1.1.1; Abbildung 17) und einer stabileren und insgesamt höheren Herzfrequenz (Kapitel 3.1.1.2; Abbildung 18), lag der Makroscore als Zeichen der Dünndarmschädigung (Einblutungen in das Dünndarmgewebe, Kapitel 3.1.2.1; Abbildung 20) signifikant unter dem der I/R-Kontrollgruppe. Ein Trend in Richtung Protektion – wenn auch ohne Signifikanz – zeigte sich auch im verringerten Hämoglobingehalt des Darmhomogenates (Kapitel 3.1.2.2; Abbildung 21). Allerdings waren die LDH-Plasmaenzymaktivitäten am Ende der Ischämie und auch bis zum Ende der Reperfusion bei allen Versuchsgruppen, die DMSO (mit oder ohne TAA-1) erhielten, signifikant höher als in der I/R-Kontrollgruppe (Kapitel 3.1.1.3; Abbildung 19 A). Am deutlichsten war dieser Anstieg bei reiner Gabe von 2 ml DMSO. Diese Plasmaenzymerhöhung konnte am Ende der Reperfusion auch für die Enzymaktivitäten von AST und ALT bei Infusion von 2 ml DMSO beobachtet werden (Kapitel 3.1.1.3; Abbildung 19 B und C), nicht jedoch bei kombinierter Gabe von TAA-1/DMSO, was ein Hinweis für eine schützende Funktion des TAA-1 vor DMSO-induzierter Toxizität sein könnte (Kapitel 4.2.1.2). Die verabreichte Menge an DMSO könnte die toxische Schwelle überschritten haben, bei der eine in der Literatur vorbeschriebene Hämolyse ausgelöst wird (Kapitel 4.2.2.2). Bei ausgeprägter Hämolyse können auch die Aktivitäten der AST und auch der ALT erhöht sein. AST wird v.a. aus zerstörten Erythrozyten freigesetzt. Erhöhungen der AST- und ALT-Aktivitäten können jedoch auch durch Fehlmessungen bei Interferenz des durch Hämolyse freigesetzten „freien“ Hämoglobins mit den analytischen Tests bedingt sein [Lippi *et al.*, 2008]. Bei der histologischen Einstufung der Schädigung durch den Park-Chiu-Score fanden sich im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe bei der 13,4 mg TAA-1- und der 2 ml DMSO-Gruppe signifikant höhere Schädigungswerte und somit Anzeichen einer Gewebeschädigung durch die hohen Substanzdosen (Kapitel 3.1.2.3; Abbildung 22). Bei Gabe von 2,6 mg TAA-1 waren weder eine Schädigung noch eine Gewebeprotektion im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe nachweisbar.

Mit den Modifikationen des Versuchsmodells (Kapitel 2.3.1.3 und 2.3.3.2) wurde versucht, die in den Vorversuchen aufgetretenen Probleme zu lösen. Ziel war u.a. auch, das Erweichen der PVC-haltigen Schläuche durch DMSO sowie die unphysiologische Flüssigkeitssubstitution über arterielle Bolusgaben zu vermeiden. Protektive

Eigenschaften des TAA-1 sollten weiter herausgearbeitet werden, indem toxische Nebeneffekte und ungünstige Einflussfaktoren möglichst minimiert wurden. Es erfolgte die Planung der Hauptversuche mit einer neuen Applikationsform für DMSO (Kapitel 2.3.1.3). So konnte die zu applizierende DMSO-Menge erheblich (um 90%) reduziert werden. Es wurden nur noch 200 µl statt 2 ml DMSO pro kg KG einmalig präischämisch in die *V. cava inferior* injiziert. Um eine Schwellendosierung der Toxizität austesten zu können und auch um andere DMSO-Effekte differenzieren zu können, wurden außerdem noch weiter verdünnte und somit geringere Dosen des Lösungsmittels (DMSO: 50 µl, 10 µl) als zusätzliche Versuchsgruppen gewählt. Da sich die besten Ergebnisse (reduzierte Einblutung, Abbildung 20 und 21) in den Vorversuchen mit der niedrigeren TAA-1-Dosis (2,6 mg/ 2 ml DMSO) erzielen ließen, wurde die Entscheidung getroffen, in den Hauptversuchen zusätzlich eine noch geringere TAA-1-Dosen (0,5 mg/ 200 µl DMSO) auszutesten, in der Hoffnung, deutlichere Schutzeffekte durch Minimierung toxischer Nebeneffekte zu erzielen.

4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

In den Hauptversuchen zur mesenterialen I/R im nun modifizierten Rattenmodell mit geringeren TAA-1- und DMSO-Dosierungen wurden recht inhomogene Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Schädigungs- und Kreislaufparameter festgestellt.

Während sich die hämodynamische Situation der Ratten beider TAA-1-Versuchsgruppen ähnlich der der I/R-Kontrollgruppe darstellte (Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2; Abbildungen 23 und 24), kam es weiterhin bei der Messung der Aktivität des Plasmaenzyms LDH zwischenzeitlich zu deutlichen Spiegelerhöhungen (Kapitel 3.2.1.4; Abbildung 29 A). Hinsichtlich vieler Darmschädigungsparameter, u.a. beim Makroscore und Hämoglobingehalt des Darmhomogenates (Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4; Abbildung 32 und 33), konnte kein Benefit durch TAA-1 im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe erzielt werden. Lediglich bei der Bestimmung der TBARS als Marker der Lipidperoxidation (Kapitel 3.2.2.2; Abbildung 31), bei einigen Parametern der Blutgasanalyse wie Laktat und Base Excess sowie den Hämoglobinwerten am Ende der Reperfusion und beim Sauerstoffpartialdruck am Ende der Ischämie (Kapitel 3.2.1.3; Abbildungen 25 und 26, Tabelle 3) konnte ein Vorteil der TAA-1-Infusion gegenüber der I/R-Kontrollgruppe gesehen werden.

Im Gegensatz zu den negativen Ergebnissen der Vorversuche, erwies sich in diesem Modell DMSO in reduzierter Dosis als protektiv. Bei zehnminütiger Infusion von 200 µl/ kg KG DMSO vor Induktion der 90-minütigen Ischämie, gefolgt von 120 Minuten Reperfusion

kam es zu einer Blutdruckstabilisierung in der Reperfusionsphase (Kapitel 3.2.1.1; Abbildung 23 B). Bei den Parametern der Blutgasanalyse zeigte sich – z.T. ähnlich zur Applikation von TAA-1 – in Bezug auf Laktat, Base Excess, Bikarbonat, Sauerstoffpartialdruck und Hämoglobingehalt ebenfalls ein physiologischeres Bild als bei der I/R-Kontrollgruppe (Kapitel 3.2.1.3; Abbildungen 25 und 26; Tabelle 3). Auch hinsichtlich einiger Parameter der Dünndarmschädigung (Einblutungen und verringerte Einwanderung von Neutrophilen in den Dünndarm) erwiesen sich 200 µl/kg KG DMSO als protektiv (Kapitel 3.2.2.1, 3.2.2.3, 3.2.2.4; Abbildungen 30, 32 und 33). Bezüglich der Plasmenzymaktivitäten von LDH jedoch stellte sich auch die deutlich reduzierte Infusion von 200 µl DMSO noch als toxisch (weil am ehesten hämolyseinduzierend; Kapitel 3.2.1.4; Abbildung 29 A, Kapitel 4.2.2.2) heraus. Es fanden sich erhöhte LDH-Spiegel vor allem am Ende der Ischämie und Beginn der Reperfusion. Die Plasmaspiegel von ALT und AST waren verglichen mit der I/R-Kontrollgruppe jedoch nicht mehr erhöht (Kapitel 3.2.1.4; Abbildung 29 B und C).

Die ebenfalls getesteten, niedrigeren DMSO-Dosierungen (50 µl bzw. 10 µl/kg KG) waren teilweise weniger protektiv als die höhere DMSO-Dosierung (200 µl/kg KG). Hämodynamisch konnte kein Vorteil im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe gefunden werden (Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2; Abbildungen 23 und 24 B). Einige Parameter der Blutgasanalyse wie das Laktat (10 und 50 µl/kg KG DMSO) und der Base Excess (10 µl/kg KG DMSO) sowie eine geringere Hämokonzentration (10 und 50 µl/kg KG DMSO) am Ende der Reperfusion waren auch hier physiologischer als bei der I/R-Kontrollgruppe (Kapitel 3.2.1.3; Abbildungen 25 und 26, Tabelle 3). Bemerkenswert ist, dass bei den niedrigeren DMSO-Dosierungen der LDH-Anstieg weitestgehend ausblieb, die Schwellendosis der Hämolyse in dieser Hinsicht wohl unterschritten wurde (Kapitel 3.2.1.4; Abbildung 29 A). In Bezug auf einige Darmschädigungsparameter (verringerte Einblutung in den Dünndarm) erwiesen sich auch die niedrigen DMSO-Dosierungen als protektiv (Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4; Abbildungen 32 und 33), außerdem konnte die histologische Schädigung durch 10 µl/kg KG DMSO signifikant verringert werden (Kapitel 3.2.2.5; Abbildung 34). In den folgenden Abschnitten wird getrennt auf die möglichen Mechanismen der positiven bzw. negativen Effekte von TAA-1 und DMSO eingegangen.

4.2.1 TAA-1-induzierte Effekte

4.2.1.1 Protektion durch TAA-1 vor mesenterialer Ischämie/Reperfusion

Protektion durch Verhinderung der Lipidperoxidation

Die in Zellkulturversuchen [Rauen et al., 2004a; Rauen et al., 2004b] nachgewiesenen protektiven Effekte und auch die in den Vorversuchen der vorliegenden Arbeit ermittelten Hinweise auf eine protektive Wirkung von TAA-1 (Kapitel 4.1) ließen sich in den – durch eine neue Applikation methodisch veränderten – Hauptversuchen nicht in der Form bestätigen. Dabei muss beachtet werden, dass auch die Methodik der Zellkulturversuche sich von dem Versuchsmodell *in vivo* deutlich unterscheidet (Kapitel 4.2.1.2).

Als Hinweis auf eine Protektion konnte gezeigt werden, dass die niedrigere TAA-1-Dosierung (0,5 mg/ 200 µl/kg KG DMSO) das Ausmaß der Lipidperoxidation (ermittelt anhand der Messung TBARS im Dünndarmhomogenat) reduzieren kann; die höhere TAA-1-Dosierung (2,6 mg/ 200 µl/kg Kg DMSO) zeigte diesen Effekt nur tendenziell (Kapitel 3.2.2.2; Abbildung 31).

Dass der Einsatz von Eisenchelatoren das Ausmaß der Lipidperoxidation reduzieren kann, wurde schon von verschiedenen Autoren demonstriert. So setzten Omar et al. 1989 Deferoxamin als Eisenchelator (20-60 mg/kg i.v., fünf Minuten vor Ischämie oder Reperfusion der Leber) in ihrem experimentellen Rattenmodell ein [Omar et al., 1989]. Sie zeigten, dass die eisenabhängige Lipidperoxidation – gemessen anhand der Entstehung von Malondialdehyd – direkt nach der Ischämie ohne Reperfusion am höchsten war. Die Infusion von 60 mg/kg Deferoxamin konnte die Menge an Malondialdehyd auf das Level der Kontrollen ohne Ischämie/Reperfusion reduzieren und verminderte gleichzeitig den histopathologischen Schaden. In einem anderen Rattenmodell zur mesenterialen Ischämie/Reperfusion wurde 30 mg/kg Deferoxamin s.c. eine Stunde vor dem 90-minütigen Abklemmen der *A. mesenterica superior* und erneut 30 mg/kg – dieses Mal i.v. – kurz vor der 150-minütigen Reperfusion verabreicht [Lutz et al., 1990]. Auch Katalase in Kombination mit SOD (jeweils 10 mg/kg) wurde in ähnlicher Weise appliziert. Dabei verringerten sowohl Katalase mit SOD als auch Deferoxamin den TBARS-Gehalt des Darmgewebes signifikant. Auch Kviety et al. fanden in ihren *in vitro* Experimenten an pulmonalarteriellen Endothelzellen von Kälbern eine deutliche Schutzwirkung sowohl durch Katalase (15 µg/ml) als auch durch DMSO (50 mM) und Deferoxamin (0,1 mM), wenn sie die Bildung von ROS durch Zugabe einer Mischung aus Hypoxanthin, Xanthin-Oxidase und einem EDTA-Eisenkomplex induzierten und das Ausmaß der Lipidperoxidation über die Menge des entstandenen Maldondialdehydes maßen [Kviety et al., 1989]. Gutteridge et al. beobachteten des Weiteren, dass die Lipidperoxidation *in*

vitro nur stattfindet, wenn zumindest eine geringe Konzentration Eisenionen vorhanden ist [Gutteridge *et al.*, 1979]. Deferoxamin verhinderte hier sowohl die eisenabhängige Haber-Weiss-Reaktion als auch die nachfolgende Lipidperoxidation. In einem Rattenmodell zur mesenterialen Ischämie/Reperfusion konnte die Infusion von Deferoxamin (10 mg/kg) den Gesamthämoglobingehalt und den Makroskore des Dünndarmes vor allem im proximalen und mittleren Anteil des Jejunums signifikant verringern [Petrat *et al.*, 2010]. In dieser Arbeit (auf deren Versuchsmodell auch die vorliegende Arbeit basiert) konnte so gezeigt werden, dass chelatisierbare, redoxaktive Eisenionen eine wichtige Rolle bei der durch I/R verursachten Dünndarmschädigung spielt. Außerdem konnten so auch makroskopische Veränderungen mit eiseninduziertem Stress (verursacht durch die zur Lipidperoxidation führenden Fenton Reaktion) in Verbindung gebracht werden.

Möglicherweise werden Eisenionen während Ischämie und Reperfusion aus ihren physiologischen Bindungen gelöst und erscheinen anschließend in einem „unusual ligand field“, also einem außergewöhnlichen Eisenpool, wie White *et al.* 1985 aus den Ergebnissen von Rao *et al.* von 1983 folgerten [White *et al.*, 1985]. Rao *et al.* beobachteten am Myokard von Hunden nach 15-45 Minuten Ischämie durch Okklusion der linken Koronararterie eine Erhöhung des Gewebemalondialdehyds, wahrscheinlich durch Induktion von Lipidperoxidation durch Reaktionen mit freien Radikalen [Rao *et al.*, 1983]. White *et al.* beschrieben ebenfalls, dass sich im Myokard nach zwei Stunden Ischämie die Gewebemengen an niedermolekular chelatisierten Eisenionen (low molecular weight; LMW) um 40% erhöht [White *et al.*, 1985]. Auch bei ihnen stiegen parallel dazu die gemessenen Mengen an Malondialdehyd. Den Zusammenhang dieses erhöhten Eisenpools und einem Benefit durch das Katalasemimetikum TAA-1/Fe stellten Rauen *et al.* 2004 heraus. Sie demonstrierten, dass ein erhöhter intrazellulärer chelatisierbarer Eisenpool – herbeigeführt durch Gabe des 8-Hydroxyquinolin-Fe(III)-Komplexes in den Zellüberstand – bei kultivierten Hepatozyten zu einer starken Zellschädigung in Form von Apoptose oder sogar bei einigen Zellen zur (sekundären) Nekrose führte. Dieser Schaden wurde von einer sauerstoffabhängigen Lipidperoxidation begleitet – gemessen durch die Bildung von TBARS – und durch den Einsatz von TAA-1/Fe deutlich vermindert [Rauen *et al.*, 2004a].

Vor dem Hintergrund der Literatur ist es naheliegend, dass TAA-1 die Lipidperoxidation im Darm in seiner Funktion sowohl als Eisenchelator als auch als Katalasemimetikum reduziert. Indirekt können diese - wenngleich geringen - Effekte als Hinweis dafür dienen, dass TAA-1 tatsächlich *in vivo* eine gewisse Wirkung entfalten kann und über den Blutkreislauf zu den Zielzellen im Darm gelangt ist. Insgesamt scheint diese verminderte Lipidperoxidation jedoch die Gesamtschädigung des Darmes nicht wesentlich zu

beeinflussen, da die Schutzeffekte durch die immer noch vorhandene Toxizität überlagert wurden: weder war die histologische Schädigung geringer noch fand sich ein geringerer Makroscore wie in den I/R-Versuchen mit dem Eisenchelator Deferoxamin (Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.4; Abbildungen 30 und 35; [Petrat *et al.*, 2010]).

Weitere protektive Effekte durch TAA-1

Zu den weiteren positiven Effekte der Applikation von TAA-1 gehören Veränderungen in den Blutgasanalysen: Die Parameter Laktat und Base Excess konnten am Ende der Reperfusion durch 0,5 mg/kg KG TAA-1 im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe signifikant stabilisiert werden (Kapitel 3.2.1.3, Abbildungen 25 und 26). Am Ende der Ischämie reduzierten beide TAA-1-Dosierungen den Abfall des Base Excess (Kapitel 3.2.1.3; Abbildung 26). Auffallend war, dass der Sauerstoffpartialdruck am Ende der Ischämie in beiden TAA-1-Gruppen (in der 0,5 mg TAA-Gruppe auch bei der Sauerstoffsättigung) signifikant höher lag als bei der I/R-Kontrollgruppe (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3). Auch das Bikarbonat lag bei der 2,6 mg TAA/kg KG-Gruppe am Ende der Ischämie signifikant höher als das der I/R-Kontrollgruppe (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3). Letztlich konnte durch beide TAA-1-Gruppen eine Hämokonzentration im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe am Ende der Reperfusion verhindert werden (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3). Diese Veränderungen weisen letztlich auf einen günstigen Einfluss des TAA-1 (oder des DMSO; Kapitel 4.2.2.1) hin. Durch welche genauen Mechanismen diese weiteren protektiven Effekte zustande gekommen sind bzw. wie sie noch gesteigert oder die Rahmenbedingungen für die optimale Wirkung von TAA-1 noch verbessert werden können, kann nur gemutmaßt werden und sollte Inhalt weiterer Forschung sein (Kapitel 4.5).

Protektion durch TAA-1 vor Schädigung durch DMSO

Nur in den Vorversuchen ergaben sich Hinweise auf eine Protektion durch TAA-1 vor DMSO-Induzierter Toxizität. Dort sorgte v.a. die Applikation von 2,6 mg TAA-1/kg KG für geringere Plasmaenzymaktivitäten der LDH, ALT und AST (Kapitel 3.1.1.3, Abbildung 19) und für geringere Einblutungen (ermittelt anhand des Makroscores; Kapitel 3.1.2.1; Abbildung 20). Bei diesen Parametern übertraf die Schädigung des Organismus durch die Applikation von 2 ml DMSO/kg KG die Schädigung durch mesenteriale I/R. Die Infusion von TAA-1 konnte dabei die durch DMSO verursachte Toxizität verhindern und sogar additive protektive Effekte bewirken. Ob der zugrunde liegende Mechanismus in der Inhibition der Reaktionskette der Fenton-Reaktion begründet liegt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht bewiesen werden. Auf die Toxizität von DMSO durch Hämolyse

bei der Applikation von hohen Dosen wird an späterer Stelle in der Diskussion genauer eingegangen (Kapitel 4.2.2.2).

4.2.1.2 Toxizität von TAA-1 und Protektion durch DMSO vor TAA-1-induzierter Toxizität

Hämodynamik unter TAA-1

Eine Stabilisierung des Blutdruckes (Kapitel 3.2.1.1; Abbildung 23) und der Herzfrequenz (Kapitel 3.2.1.2; Abbildung 24) durch die Applikation von 2,6 mg bzw. 0,5 mg TAA-1/kg KG blieb in allen Versuchen aus, die Tiere hatten ähnlich niedrige Werte wie die I/R-Kontrolltiere. Wenn beachtet wird, dass 200 µl/kg KG DMSO den Blutdruck in den Hauptversuchen signifikant stabilisieren konnte, muss postuliert werden, dass TAA-1 in dieser Hinsicht negative Auswirkungen hat und den durch DMSO stabilisierten Blutdruck (Kapitel 4.2.2.1) erniedrigte. Jedoch sorgte die Applikation von TAA-1 nicht für eine additive Schädigung über die der I/R-Kontrollgruppe hinaus.

Erhöhung der Plasmaenzymaktivitäten

Sowohl in den Vor- als auch in den Hauptversuchen waren in den TAA-1-Gruppen die Plasmaenzymaktivitäten der LDH (Kapitel 3.1.1.3 und 3.2.1.4; Abbildungen 19 und 29) signifikant erhöht. In den Vorversuchen war die LDH-Freisetzung in den TAA-1-Gruppen am Ende der Reperfusion geringer als nach der Applikation von DMSO alleine, was auf eine mögliche Protektion des TAA-1 vor DMSO-induzierter Hämolyse (Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2.2) hinweist. In den Hauptversuchen fand sich dieser Effekt jedoch nicht mehr, hier lagen die LDH-Werte der 0,5 mg TAA-1- und der 200 µl DMSO-Gruppe auf ähnlichen Niveaus. 2,6 mg TAA-1 bewirkte allerdings eine noch größere LDH-Erhöhung am Ende der Ischämie und Beginn der Reperfusion als 0,5 mg TAA-1 und 200 µl DMSO, was für eine additive Toxizität von höheren Dosen TAA-1 auf Erythrozyten spricht.

Die LDH-Erhöhung in den Vorversuchen trat vor allem am Ende der Reperfusion, in den Hauptversuchen vor allem am Ende der Ischämie und zu Beginn der Reperfusion auf. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Applikation des TAA-1/DMSO zurückzuführen, da in den Vorversuchen TAA-1/DMSO kontinuierlich über einen längeren Zeitraum (für 30 Minuten vor der Ischämie und dann ab 30 Minuten vor der Reperfusion für insgesamt 90 Minuten) infundiert wurde. Der Großteil der TAA-1- und DMSO-Dosis wurde also erst in der Reperfusion infundiert, was sich vor allem in der letzten Blutabnahme am Ende der Reperfusion mit der deutlichen LDH-Erhöhung zeigte. In den

Hauptversuchen wurden TAA-1 und DMSO dagegen nur einmalig vor der Ischämie über zehn Minuten infundiert: daher zeigten sich die LDH-Erhöhungen schon bei den Blutabnahmen vor der Ischämie (hier ohne Signifikanz) und am Ende der Ischämie sowie kurz nach Beginn der Reperfusion. Dass es am Ende der Reperfusion zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den TAA-1/DMSO-Gruppen und der I/R-Kontrollgruppe mehr kam, weist auch darauf hin, dass die LDH-Erhöhung ein temporärer Effekt wie am ehesten die Hämolyse ist und nicht eine verstärkte Schädigung der Zellen des Darmes bedeutet. Umfangreiche Literatur zur Toxizität von DMSO durch Hämolyse unterstreichen diese Theorie (Kapitel 4.2.2.2).

In den Hauptversuchen wurde die applizierte DMSO-Menge deutlich reduziert. Hämolytische Effekte konnten jedoch weiterhin nicht vermieden, sondern nur reduziert werden. In den bisherigen Publikationen schien TAA-1 keinen toxischen Effekt auf Zellen auszuüben (Kapitel 1.4; [Rauen et al., 2004b]): So hatte die Inkubation von kultivierten Hepatozyten und Endothelzellen mit entweder 6 μ M TAA-1 oder 30 μ M TAA-1/Fe in DMSO für 4 Stunden keinen Effekt auf die LDH-Freisetzung. Auch morphologische Zellveränderungen waren nicht erkennbar. Vermutlich führte aber die kumulative Infusion der höheren TAA-1-Dosierung und DMSO über einen sehr kurzen Zeitraum zu einem vor allem lokal akuten toxischen Effekt, wohlmöglich auch durch die kurzzeitige Erhöhung der Plasmaosmolalität [Peterson und Robertson, 1967] und damit zur Hämolyse mit erythrozytärer LDH-Freisetzung. Eine Blutgasanalyse direkt nach Infusion von TAA-1/DMSO hätte zusätzliche Erkenntnisse liefern können. Die nächste Blutgasanalyse erfolgte erst am Ende der Ischämie über mehr als 90 Minuten nach Infusion der Substanzen. Zu diesem Zeitpunkt war nur in der 2,6 mg TAA-1-Gruppe (nicht jedoch in der 200 μ l DMSO-Gruppe) eine temporäre Zunahme der Osmolalität im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe nachweisbar. Am Ende der Reperfusion waren keine Veränderungen der Osmolalität mehr erkennbar (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3). Auf die Unterschiede der *in vitro* und *in vivo* Applikation von TAA-1/DMSO wird weiter unten in diesem Kapitel ausführlich eingegangen.

Effekte von TAA-1 auf die lokalen Parameter der Darmschädigung

In Bezug auf fast alle Parameter der Dünndarmschädigung – mit Ausnahme der Entstehung von TBARS – erwies sich TAA-1 in den Hauptversuchen als nicht protektiv. Mehr noch: bei den Parametern, bei denen sich DMSO als positiv herausgestellt hat (z.B. Makroscore; Kapitel 3.2.2.4; Abbildung 33, Hämoglobingehalt des Darmhomogenates; Kapitel 3.2.2.3; Abbildung 32; Einwanderung der Neutrophilen; Kapitel 3.2.2.1; Abbildung

30), wurde diese Protektion durch gleichzeitige Gabe von TAA-1 abgeschwächt. Bei der Applikation von TAA-1 zeigten sich bei allen Darmschädigungsparametern tendenziell geringere Werte als bei der I/R-Kontrollgruppe, was gegen eine additive Toxizität über die „normale“ Schädigung durch I/R hinaus spricht. Wodurch sich die herabgesetzte Schutzwirkung des DMSO in der Kombination mit TAA-1 ergibt ist unklar.

Deutlich zu beobachten war eine Toxizität nach der Applikation hoher TAA-1-Dosen. In den Vorversuchen erhöhte die Applikation von 13,4 mg TAA-1/kg KG die histologische Schädigung durch die mesenteriale I/R um fast das doppelte (Kapitel 3.1.2.3; Abbildung 22). Auch die Schädigung durch 2 ml DMSO/kg KG wurde von dieser hohen TAA-1-Dosis noch übertroffen. Im Rahmen von allerersten eigenen Vorversuchen mit TAA-1 wurde eine noch höhere Dosis eingesetzt: das Versuchstier wurde rasch nach Beginn der Infusion von 40 mg TAA-1/kg KG hämodynamisch instabil sowie respiratorisch insuffizient und verstarb noch vor Ende des Versuchs (Daten nicht gezeigt). Da sich ansonsten keine Besonderheiten der Versuchsdurchführung ergeben hatten, wurde der Tod der Ratte auf die zu hohe und damit schädliche TAA-1-Dosierung zurückgeführt und alle weiteren Versuche mit niedrigeren Dosierungen geplant.

Einordnung der Effekte von TAA-1 in den Vorversuchen

Der Mechanismus der teilweise positiven Effekten der Vorversuche ist unklar: es wurde durch 2,6 mg TAA-1/kg KG der Blutdruck tendenziell stabilisiert (Kapitel 3.1.1.1; Abbildung 17) und signifikant die Einblutung in den Darm vermindert (Kapitel 3.1.2.1; Abbildung 20). Einige Ergebnisse – wie die toxischen Effekte z.B. von DMSO in Bezug auf die LDH-Freisetzung – konnten wiederum in den Hauptversuchen reproduziert werden. Möglicherweise spielt die Art der Applikation von TAA-1/DMSO eine Rolle. Durch kontinuierliche Infusion kann sich TAA-1 vermutlich anders im Körper der Ratte verteilen und zellulär besser aufgenommen werden als bei einmaliger Gabe. Dieser Umstand ist vermutlich auch für die deutlicheren Schutzeffekte in früheren Zellkulturversuchen verantwortlich: In diesen Versuchen konnten die Zellen z.T. mehrere Stunden mit TAA-1 vorinkubiert werden, so dass mehr Zeit für die zelluläre Aufnahme des TAA-1 blieb [Rauen et al., 2004b]. Auch toxische Effekte könnten bei der Kurzinfusion größer sein als bei sehr langsamer Applikation und so potentielle Schutzeffekte überlagern. Durch deutlich reduzierte DMSO-Dosen konnte das TAA-1 möglicherweise schlechter in Lösung gehalten werden und sorgte so wiederum für zusätzliche Toxizitäten. Außerdem scheint es möglich, dass TAA-1 aufgrund seiner Hydrophobizität hepatisch eliminiert wird und so

der Blutspiegel eventuell bereits nach kurzer Zeit unter der erforderlichen Konzentration liegt.

Ein Mechanismus, mithilfe dessen TAA-1 einen höheren Blutdruck aufrechterhält oder die Einblutung verringert, konnte mit Hilfe der vorliegenden Daten nicht identifiziert werden.

Vergleich der Protektion durch TAA-1 in vivo und in vitro

Nach der Konzeption und Synthese von TAA-1 und TAA-1/Fe sowie Feststellung der Fähigkeit zur Chelatisierung von Eisenionen sowie katalasemimetischen Aktivität [Sustmann *et al.*, 2007] wurde in einer späteren Studie an Zellkulturen nachgewiesen, dass der Vorläufer TAA-1 tatsächlich in der Lage ist, die Zellmembran von Hepatozyten zu durchdringen und sich intrazellulär infolge der Chelatisierung von Eisenionen das aktive Katalasemimetikum bildet [Rauen *et al.*, 2009]. Bereits 2004 zeigten Rauen *et al.*, dass nach bis zu 24-stündiger Präinkubation von Hepatozyten und Leberendothelzellen mit in DMSO gelöstem TAA-1 (6 μM) oder TAA-1/Fe (30 μM) die Zellen vor wasserstoffperoxid-, histidin-, hypothermie- und eiseninduzierter Schädigung geschützt werden [Rauen *et al.*, 2004b]. Auf das der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende *in vivo*-Rattenmodell waren diese standardisierten Versuchsbedingungen einer Zellkultur nicht zu 100% übertragbar: Mit lebenden Versuchstieren war der zeitliche Rahmen der Versuchsdauer und -durchführung limitiert; die „zelluläre Inkubationsperiode“, d.h. die präischämische TAA-1-Infusion, musste in den Hauptversuchen auf nur 30 Minuten begrenzt werden. Außerdem waren die Zielzellen (die Zellen des Darmgewebes) nicht von einem im Vergleich zum Gesamtzellvolumen großen extrazellulären Volumen (dem Zellüberstand der Zellkulturflaschen) mit TAA-1/DMSO umgeben, sondern von normalem Gewebe mit dem Blutstrom als einzige Quelle für die Testsubstanzen. Aus diesen Gründen konnte TAA-1 im Zellkulturversuch wahrscheinlich intrazellulär stark akkumulieren, wohingegen in der Ratte diese eventuell erforderliche intrazelluläre Konzentration des TAA-1 (trotz Einsatz von höheren Konzentrationen) nicht erreicht werden konnte. Obwohl das TAA-1 direkt in die *V. cava inferior* als eine der größten Venen appliziert wurde, war unklar, ob und wie sich das TAA-1 durch die Zirkulation verteilt und ob tatsächlich eine ausreichende Konzentration im Darm erreicht werden konnte. Die Reduktion der TBARS im Darmgewebe bei Infusion von TAA-1 (Kapitel 3.2.2.2; Abbildung 31) lässt jedoch die Vermutung zu, dass zumindest ein Teil des TAA-1 den Darm erreicht hat. Des Weiteren wurden die Zellkulturversuche an Hepatozyten und Leberendothelzellen durchgeführt – möglicherweise sind die Zellen des Dünndarmes empfindlicher für TAA-1/DMSO-induzierte Toxizität.

Die Plasmaenzymerrhöhung der LDH macht ein weiteres Problem deutlich: Wie am Verlauf der Vor- und Hauptversuche gesehen wurde, ist die Menge an DMSO begrenzt, die ein lebender Organismus toleriert ohne Zeichen einer Toxizität zu entwickeln. Das führte dazu, dass nur sehr kleine Mengen DMSO mit möglichst hohen TAA-1-Dosen gegeben werden konnten, auch wenn der umgekehrte Fall wie in den Zellkulturen (großer Zellüberstand mit geringen TAA-1-Dosen und wenig DMSO) für die sichere Verteilung im Körper der Ratte vermutlich sinnvoller gewesen wäre.

Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass bei den Zellkulturversuchen mit blutfreien Medien gearbeitet wurde. Die durch DMSO induzierte Hämolyse (Kapitel 4.2.2.2) durch Lyse von Erythrozyten konnte demnach im Zellkulturversuch nicht stattfinden und somit keine wie für *in vivo*-Versuche beschriebenen systemischen Effekte und Nierenschäden bewirken. Auch konnte das durch Hämolyse freigesetzte Hämoglobin im Zellkulturversuch die enzymatischen Tests nicht durch Interferenzen und verfälschte Werte stören [Lippi *et al.*, 2008].

Die Versuchsbedingungen und die Erfolg versprechenden Versuchsergebnisse der Zellkulturversuche konnten insgesamt auf dieses *in vivo*-Modell nur eingeschränkt übertragen und bestätigt werden.

4.2.2 DMSO-induzierte Effekte

4.2.2.1 Protektion durch DMSO vor mesenterialer Ischämie/Reperfusion

Die Publikationen zum protektiven Einfluss von DMSO bei experimenteller mesenterialer Ischämie und Reperfusion sind vielfältig und umfassen eine Vielzahl von verschiedenen untersuchten Parametern, die in ihrer Gesamtheit schwer mit den vorliegenden Ergebnissen zu vergleichen sind. Es wurde dabei insgesamt mehr über die resultierenden Schutzeffekte und weniger über die zugrundeliegenden Mechanismen berichtet.

Ravid *et al.* zeigten beispielsweise DMSO-Effekte an ihrem Modell zur segmentalen intestinalen Ischämie (150 Minuten) der Ratte [Ravid *et al.*, 1983]. Es wurde am Ende der Ischämie intravenös eine 20%ige DMSO-Lösung (3 g/kg KG) infundiert, anschließend erfolgte eine 24-stündige Reperfusionsphase, wonach sich der Darm unter DMSO-Therapie vollständig von seinen ischämischen Läsionen erholen konnte. Die Autoren klemmten außerdem in einer weiteren Versuchsreihe die komplette *A. mesenterica superior* einmal für 30 Minuten, einmal für 60 Minuten ab. Hier überlebten durch die Anwendung von DMSO deutlich mehr Tiere. Statt eines nekrotischen Darms mit Perforationen und Peritonitis zeigten sich lediglich geringe Ödembildung,

Farbveränderungen der Darmwand sowie histologisch entzündliche Infiltrate. Demetriou et al. unterzogen Ratten einer 30-minütigen Ischämie durch Abklemmen der *A. mesenterica superior* [Demetriou et al., 1985]. Am Anfang der nachfolgenden 48-stündigen Reperfusion wurden 8 ml 20%ige DMSO-Lösung (1 ml/min) i.v. infundiert. Ein ähnlicher Versuch wurde mit intraperitonealer Applikation von DMSO (4 ml 20%ige DMSO-Lösung) durchgeführt. Die Bauchhöhle wurde auf das Vorhandensein von freier Flüssigkeit, Adhäsionen, Gangrän des Darmes, Ileus und intraabdominelle Blutungen untersucht. Mit i.v. DMSO behandelte Ratten hatten signifikant weniger Schädigungszeichen (lediglich leichter Ileus, etwas freie Flüssigkeit). Die i.p.-Applikation zeigte dagegen keinen protektiven Effekt. Die Autoren vermuteten als Mechanismus eine Kombination aus antientzündlichem und membranstabilisierendem Effekt sowie der Fähigkeit von DMSO als Radikalfänger und Plasmaexpander zu agieren und die Plättchenaggregation zu verhindern [Demetriou et al., 1985].

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basierend auf bereits publizierten Mechanismen der Protektion durch DMSO diskutiert.

Verbesserte Hämodynamik durch DMSO

Durch Infusion von 200 µl DMSO stabilisierte sich der Blutdruck in der Reperfusion signifikant (Kapitel 3.2.1.1; Abbildung 23 und B). Damit vereinbar war auch eine deutlich geringere Volumengabe durch Bolusapplikation (Abbildung 23 C).

In früheren Studien wurde das Blutdruckverhalten unter DMSO-Therapie mehrfach untersucht. Wurde in einer Studie Katzen intravenös DMSO verabreicht, so konnte eine Apnoe bei Bolusgabe von 200 mg/kg DMSO – aber nicht bei kontinuierlicher Infusion – und vorübergehende Herzfrequenz- und Blutdruckabfälle beobachtet werden [DiStefano und Klahn, 1965]. Bei i.v.-Infusion (90 ml/h) 40%iger DMSO-Lösung wurde bei nicht narkotisierten Kaninchen eine initiale Erhöhung der Herzfrequenz und ein geringer, aber konstanter Blutdruckanstieg über die gesamte Versuchsdauer gefunden [Caujolle et al., 1967]. Ein initialer Blutdruckabfall wurde nicht beobachtet. Eine weitere Studie konnte ebenfalls Blutdruckveränderungen nachweisen, schrieb diese jedoch eher der deutlich höheren Osmolarität der injizierten DMSO-Lösung zu [Peterson und Robertson, 1967]. Auch Demetriou et al. vermuteten, nachdem DMSO in ihren Versuchen den Rattendünndarm deutlich vor einer Schädigung durch 30-minütiges Abklemmen der *A. mesenterica superior* schützte, dass i.v. appliziertes DMSO (s.o.) durch seine Hyperosmolarität als Plasmaexpander wirkt und das intravaskuläre Volumen und damit das Herzzeitvolumen erhöht und für eine verbesserte Perfusion der Mesenterialgefäße

sorgt [Demetriou *et al.*, 1985]. Da in den Versuchen der vorliegenden Arbeit eine Blutdruckerhöhung nur bei der Infusion von 200 µl DMSO/kg KG auftrat und nicht bei 50 oder 10 µl/kg KG, scheint es möglich, dass DMSO seine blutdruckstabilisierende Wirkung tatsächlich primär über seine Funktion als Plasmaexpander ausübt. Demnach sind geringere Mengen von DMSO nicht mehr ausreichend, um denselben Effekt zu erzielen. Eine Dosis von 200 µl/kg KG DMSO entspricht 220 mg/kg KG (Dichte: 1,1 g/cm³) und ist damit – im Vergleich zu den Dosierungen der im vorliegenden Kapitel rezipierten Studien eher im sehr niedrigen Bereich anzusiedeln. Abgesehen von der Blutdruckerhöhung durch höhere Osmolalität wurden bisher keine genauen Mechanismen der Blutdruckstabilisierung beschrieben. Eine alleinige Stabilisierung des Blutdruckes durch Erhöhung der Osmolalität bei derartig niedrigen Dosierungen muss bezweifelt werden. In den Blutgasanalysen ergaben sich zudem keinerlei Veränderungen der Osmolalität bei alleiniger DMSO-Infusion (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3). Allerdings muss dazu bemerkt werden, dass bei vielen BGA-Geräten die Osmolalität entsprechend einer Formel (meist überwiegend basierend auf der Natriumkonzentration) berechnet und nicht direkt gemessen wird [Fazekas *et al.*, 2013]. Rein rechnerisch müsste die Applikation von 200 µl DMSO/kg KG (Molekulargewicht von DMSO 78,13 g/mol; 220 mg DMSO entsprechen 2,8 mmol) die Osmolalität (bei 65 ml Blut/kg Ratte) um etwa 43 mmol/kg anheben, was bei einer Osmolalität des Blutplasmas von 275 – 320 mmol/kg durchaus relevant sein könnte. Zudem wurde die Osmolalität erst am Ende der Ischämie – sehr lange nach Applikation des DMSO – bestimmt. Bis dahin kann DMSO längst in die Zellen aufgenommen worden und nicht mehr osmotisch aktiv sein. Der tatsächliche Einfluss von DMSO auf die Osmolalität in den hier durchgeführten Versuchsserien ist daher nicht bekannt.

Es muss eher davon ausgegangen werden, dass durch den Schutz des Darmes vor I/R-Schädigung (z.B. durch Verbesserung des Blutflusses s.u.) die Menge der eingeschwemmten toxischen und hämodynamisch aktiven Metabolite reduziert werden. Dadurch werden insgesamt stabilere und höhere Blutdruckwerte erreicht, die wiederum für eine verbesserte Perfusion auch der mesenterialen Gefäße in der Reperfusion sorgen und somit weitere Schäden verhindern können.

Verringerung der Einblutung in den Darm durch DMSO

Alle drei im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten DMSO-Dosen konnten – im Gegensatz zur zusätzlichen Gabe von TAA-1 – signifikant die Einblutung in den geschädigten Darm verringern, zu sehen an einem verringerten Makroscore einerseits (Kapitel 3.2.2.4; Abbildung 33) und einem verminderten Gewebehämoglobin (Kapitel

3.2.2.3; Abbildung 32). Es gibt theoretisch mehrere Möglichkeiten, über welche Mechanismen DMSO die Einblutung verringert. Allen gemeinsam ist letztlich eine Verbesserung des Blutflusses, wobei im Folgenden auf mehrere ursächliche Mechanismen eingegangen werden soll.

Der erste Mechanismus ist möglicherweise eine Modulation der Thrombozytenfunktion durch DMSO: Aydemir-Koksoy et al. zeigten an Kaninchen, dass eine mesenteriale Ischämie von 60 Minuten und Reperfusion von 120 Minuten die Thrombozytenfunktion deutlich veränderte (Kapitel 1.1.6; [Aydemir-Koksoy, 1999]). So sank die Gesamtplättchenzahl, möglicherweise durch Adhärenz von Plättchen an Darmgewebe. Außerdem wurde in der Reperfusion die Thrombozytenaggregation deutlich vermindert. An die Gefäßwand adhärierte Plättchen können weitere Signalstoffe freisetzen und so Neutrophile anlocken. Diese könnten wiederum durch Freisetzung weiterer Mediatoren Ödeme induzieren [Kurose et al., 1997]. Sollte DMSO in der Lage sein, die initiale Plättchenadhärenz an die kleinen Gefäße des Dünndarmes zu verhindern, könnte sukzessive eine Freisetzung von Mediatoren aus Thrombozyten verhindert werden. Eine verminderte Aggregation von Thrombozyten könnte zudem den Blutfluss in kleinen Gefäßen verbessern. Hinweise auf eben diese Effekte von DMSO liefern die folgenden Studien. Saeed et al. konnten zeigen, dass DMSO in Konzentrationen von 1 - 5% *in vitro* die Plättchenaggregation, ausgelöst durch ADP, Arachidonsäure, plättchenaktivierenden Faktor oder Kollagen, verhindern kann [Saeed et al., 1988]. DMSO hatte vor allem Einfluss auf die ADP- und kollagenvermittelte Plättchenaggregation. Auf die Thromboxanproduktion hatte die Inkubation von Plättchen mit 1 - 30% DMSO keinen Einfluss. Rosenblum untersuchte den Effekt von DMSO auf die Plättchenaggregation *in vivo* [Rosenblum, 1983]. Er induzierte in einem Mausmodell die Plättchenaggregation durch Verletzung von Arteriolen der *Dura pia* an Gehirnen und des Mesenteriums. DMSO wurde in unterschiedlichen Dosierungen (5, 0,5 und 0,05 ml/kg KG, bei pialen Arteriolen i.p., bei mesenterialen Arteriolen s.c.) eine Stunde vor Induktion der Plättchenaktivierung injiziert. Dosisabhängig wurde die Plättchenaggregation in den pialen Arteriolen durch DMSO gehemmt, bei den mesenterialen Arteriolen wurde die Plättchenaggregation nur durch die höchste DMSO-Konzentration gehemmt (5 ml/kg KG) [Rosenblum, 1983]. Haller et al. zeigten 1987, dass wiederholte intraperitoneale Gaben von DMSO (1,5 g/kg) das Überleben von abdominalen Insellappen signifikant erhöht [Haller et al., 1987]. Dabei wurde an Ratten im Bereich der rechten epigastrischen Gefäße ein Insellappen freipräpariert und nach Ligatur der linken epigastrischen Gefäße an dieselbe Stelle wieder eingenäht. Auch am dritten postoperativen Tag wurde eine deutlich verbesserte Perfusion der Insellappen nach DMSO-Gabe nachgewiesen.

Der zweite Mechanismus, der zur geringeren Einblutung in das Darmgewebe beitragen bzw. damit assoziiert sein könnte, wird durch Parks et al. aufgezeigt [Parks et al., 1984]. Sie infundierten intraarteriell 20 mg DMSO/kg KG und konnten so die durch ROS induzierte erhöhte vaskuläre Permeabilität bei segmentaler Ischämie des Ileums signifikant verringern. Außerdem verhinderte DMSO (10 mM) in Studien zur vaskulären Permeabilität größtenteils die Extravasation von Makromolekülen, wenn Hamsterwangen mit einer Lösung aus Hypoxanthin und Xanthin-Oxidase perfundiert und so Gefäßwandschäden, arterielle Vasokonstriktion und Adhärenz von Leukozyten durch den Einfluss von ROS induziert wurden [Del Maestro et al., 1981].

Andere Studien bewiesen - als dritten möglichen Mechanismus - den Zusammenhang zwischen DMSO und einer verminderten Einwanderung oder Chemotaxis von Neutrophilen [Sekizuka et al., 1989]. Dieses wird ausführlich weiter unten in diesem Kapitel diskutiert. Infolge weniger - durch Neutrophile induzierte - Signalkaskaden sowie durch weniger akkumulierende Neutrophile selbst und damit insgesamt geringere Gefäßwandschäden kommt es so möglicherweise nicht nur zum geringeren Austritt von Makromolekülen, sondern auch von Erythrozyten.

Alle diese Wirkungen von DMSO verbessern letztendlich die Mikroperfusion des geschädigten Darmes. Kleinste Gefäße werden in geringerem Maße durch an der Gefäßwand adhärierende Thrombozyten und konsekutiv auch Neutrophile verstopft. Es resultieren weniger nekrotische Infarktareale, in die es sonst über offene Kollateralen einblutet und bei denen es so zur hämorrhagischen Infarzierung kommt (Kapitel 1.1.4).

Verringerung der Neutrophileninfiltration durch DMSO

Die Applikation von 200 µl DMSO/kg KG konnte die Anzahl der eingewanderten neutrophilen Granulozyten in den ischämischen Darm signifikant verringern (Kapitel 3.2.2.1; Abbildung 30).

Hernandez et al. versuchten die Frage zu klären, ob Neutrophile der Grund für I/R-Schädigung am Ileum von Katzen sind, oder ob ihre Anhäufung im Gewebe ein Effekt der I/R-Schädigung sei [Hernandez et al., 1987]. Dazu benutzten sie ein Antineutrophilenserum und monoklonale Anti-Neutrophilen-Antikörper, welche sie präischemisch in die *A. mesenterica superior* infundierten. Die Anzahl der Neutrophilen im Blut konnte mithilfe des Antineutrophilensersums auf etwa 5 % gesenkt werden; die monoklonalen Antikörper verhinderten eine Anheftung der Neutrophilen an die Gefäßwände. Sowohl der Einsatz des Antineutrophilensersums als auch die monoklonalen Antikörper reduzierten die durch I/R (60 Minuten low-flow Ischämie, 120 Minuten

Reperfusion) erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität des Darmgewebes deutlich. Sie schlussfolgerten, dass Neutrophile den I/R-Schaden durch zwei Mechanismen vermitteln: einerseits durch Verstopfen der mikrovaskulären Strukturen, und damit durch Verstärkung des ischämischen Insultes, und andererseits durch das Freisetzen von zytotoxischen Substanzen in der Nähe von Endothel- oder Parenchymzellen [Hernandez *et al.*, 1987].

Grisham *et al.* stellten einen Zusammenhang zwischen den durch Xanthin-Oxidase generierten ROS und der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den geschädigten Darm her [Grisham *et al.*, 1986]: Demnach könnten ROS entweder die Mukosa direkt schädigen und anschließend über die Freisetzung weiterer Gewebefaktoren das Komplementsystem zur Produktion von chemotaktischen Faktoren wie C5a oder C3a anregen, die wiederum Neutrophile anlocken. Eine andere Theorie wäre, dass ROS direkt mit Lipoproteinen interagieren, welche wiederum als chemotaktische Faktoren fungieren. Die mukosale Schädigung und nachfolgende Entzündung würde in diesem Fall direkt durch die eingewanderten Neutrophilen verursacht [Grisham *et al.*, 1986]. Ein vermindertes Entstehen von ROS oder deren rasche Inaktivierung durch Radikalfänger wie DMSO könnten so nicht nur die Mukosa schützen, sondern auch die Einwanderung der Neutrophilen verhindern.

Sekizuka und Benoit bewiesen 1989, dass DMSO das Adhärieren von Leukozyten an die Gefäßwände im Darmgewebe verhindern kann [Sekizuka *et al.*, 1989]. Dazu untersuchten sie das distale Kolon von Ratten mithilfe eines Intravitalmikroskops und umgaben den Darm für 10 Minuten mit verschiedenen verdünnten DMSO-Lösungen (0,14 bis 140 mM). Anschließend wurde die Leukozytenadhäsion durch Zugabe von N-Formyl-Methionyl-Leukyl-Phenylalanin oder Leukotrien B₄ induziert. Es wurde ein von der DMSO-Dosis abhängiges, deutlich vermindertes Anheften der Leukozyten gefunden [Sekizuka *et al.*, 1989]. Antony *et al.* beschrieben außerdem 1983, dass DMSO *in vivo* (2 - 2,4 g/kg DMSO i.v.) die pleurale Infiltration (stimuliert durch Infektion mit *Staphylococcus aureus*) von Neutrophilen und Monozyten in Kaninchen hemmt [Antony *et al.*, 1983]. Zusätzlich wiesen sie nach, dass DMSO auch *in vitro* (bis 280 mM DMSO) dosisabhängig die Fortbewegungsfähigkeit der stimulierten Neutrophilen und Monozyten herabsetzt.

Zimmerman *et al.* untersuchten den Einfluss von Katalase (150 000 U/kg i.v. jeweils 10 Minuten vor der Ischämie und vor der Reperfusion), Deferoxamin (15 mg/kg x h i.v.) und DMSO (20 mg/kg i.v., beide Substanzen wurden ab 10 Minuten vor der Ischämie bis zum Ende der Reperfusion appliziert) in Bezug auf ihre Fähigkeit, die Infiltration von Neutrophilen in die Mukosa des Ileums der Katze infolge einer low-flow Ischämie (180 Minuten) und Reperfusion (60 Minuten) zu verhindern [Zimmerman *et al.*, 1990]. Die Aktivität der Myeloperoxidase in der Mukosa als Hinweis für die Einwanderung von

Neutrophilen wurde durch die Infusion mit entweder Katalase oder Deferoxamin deutlich vermindert. DMSO verringerte die Einwanderung der Neutrophilen nicht. Die Autoren vermuten jedoch, dass ein positiver Effekt des DMSO möglicherweise durch den potentiell schädigenden Effekt der exothermen Reaktion bei Infusion von DMSO zunichte gemacht wurde [Zimmerman *et al.*, 1990]. Turnage *et al.* stützten mit ihrer Arbeit 1994 die Hypothese, dass das Hydroxylradikal über Komplementaktivierung und Produktion des chemotaktischen Faktors C5a eine Rolle bei der Aktivierung von Neutrophilen spielt [Turnage *et al.*, 1994]. Falls DMSO tatsächlich auch als Hydroxylradikalfänger fungiere, würde über diese Signalkette ebenfalls die Adhäsion von Neutrophilen verringert.

Verringerung der histologischen Schädigung durch DMSO

Durch Applikation von 10 µl/kg KG DMSO konnte in den Hauptversuchen die histologische Schädigung des Rattendünndarmes signifikant verringert werden (Kapitel 3.2.2.5; Abbildung 34). Dies überrascht insofern, da es nicht mit den übrigen Ergebnissen übereinstimmt: die Einwanderung von Neutrophilen wurde nur durch Applikation von 200 µl/kg KG DMSO inhibiert (Kapitel 3.2.2.1; Abbildung 30), der Darm jedoch von allen drei DMSO-Dosen (200 µl, 50 µl und 10 µl/kg KG DMSO) vor Einblutungen geschützt (Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4; Abbildungen 32 und 33).

Allerdings wird auch in der Literatur kontrovers diskutiert, ob DMSO in der Lage ist, I/R-Schäden am Darm zu verhindern. Während einige Autoren Zeichen eines Schutzes z.B. in Form von geringeren intraabdominellen Adhäsionen, einer geringeren Entzündungsreaktion, weniger Darmwandnekrosen [Demetriou *et al.*, 1985], geringeren Raten von Darmperforationen oder verminderten Zeichen einer Peritonitis [Ravid *et al.*, 1983] sahen, fanden andere keine positiven Effekte z.B. in Bezug auf die histologische Schädigung [Mirkovitch und Winistörfer, 1987].

An Ponys wurde durch Arden *et al.* getestet, ob eine zehnminütige Infusion von DMSO (1 g/kg in 1 L Ringerlaktat kurz vor der Reperfusion) das Jejunum vor Schäden durch 60 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion schützt [Arden *et al.*, 1990]. Die Autoren benutzten zur Evaluation der histologischen Schädigung entsprechend der vorliegenden Arbeit den Chiu-Score und fanden heraus, dass DMSO in ihrem Modell den Darm nicht vor Schädigung schützt. Sie vermuteten, dass die in der Literatur beschriebenen ambivalenten Ergebnisse für DMSO auch dadurch zustande kommen, dass verschiedene Modelle für Ischämie und Reperfusion verwendet wurden: einige würden Versuche mit einer kompletten Okklusion der jeweiligen Arterie durchführen, während andere eine low-

flow Ischämie wählten. Dabei scheint DMSO in Versuchen mit kompletter Okklusion keinen Schutzeffekt zu vermitteln [Arden *et al.*, 1990; Carati *et al.*, 1988].

Dabareiner *et al.* studierten den Effekt von DMSO in Bezug auf eine 60-minütige low-flow Ischämie und 3,5 Stunden Reperfusion am Jejunum von Pferden. 20 mg/kg DMSO wurde einmalig 10 Minuten vor Beginn der Reperfusion infundiert [Dabareiner *et al.*, 2005]. Sie entdeckten, dass die mikrovaskuläre Permeabilität des Jejunums in der DMSO-Gruppe deutlich geringer war. Bei der histologischen Untersuchung wurden eine morphologisch unauffällige Mukosa und nur leichte Ödeme der Submukosa und Serosa gefunden. Ultrastrukturell war die Mikrovillischicht intakt, direkt darunter fanden sich jedoch Vakuolen (vereinbar mit Park-Chiu-Score 1, Kapitel 2.3.2.3.4). In den Kapillaren gab es einige Unterbrechungen der endothelialen Zellverbindungen, die Zellen und auch deren Mitochondrien waren leicht ödematös. Insgesamt vermuteten die Autoren als Mechanismus für die Protektion die Verhinderung der Neutrophilenadhärenz am Endothel (s.o.) und damit einhergehend einen verbesserten Blutfluss; durch verringerte Kapillarpermeabilität käme es zu geringerem Ausstrom von Plasmaproteinen und somit zur geringeren Ödembildung. Es wurde postuliert, dass wenn Ödembildung in geringerem Maße auftritt, das Gewebe insgesamt geringer geschädigt wird, da der Abstand zur Kapillare und damit zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung nicht vergrößert wird.

Anhand der Literatur zur Schädigung durch Neutrophile (Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, mukosale Entzündung; s.o.), hätte man einen positiven Effekt auf den Park-Chiu-Score v.a. bei 200 µl/kg KG DMSO erwartet. Letztlich entsteht ein geringerer histologischer Schaden wohlmöglich durch die Kombination aus verringerter Einblutung, weniger Ödemen und Extravasationen. Im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe konnte die Applikation von 10 µl/kg KG DMSO die Infiltration durch Neutrophile auch verringern – wenn auch nicht signifikant und ähnlich den anderen TAA-1/DMSO-Versuchsgruppen. Weitere (unbekannte) Mechanismen, durch die sich DMSO in niedriger Dosierung protektiv auf die Darmschädigung auswirken kann, sind ebenfalls denkbar.

Stabilisierung des Säure-Basen-Haushaltes durch TAA-1/DMSO und DMSO alleine

Insgesamt war in den Versuchen erkennbar, dass die I/R-Versuchstiere erniedrigte pH- und BE-Werte sowie eine erhöhte Atemfrequenz (Kapitel 3.2.1.3) aufwiesen. Dies spricht für eine metabolische Azidose mit dem Versuch einer respiratorischen Kompensation, die durch sinkende pCO₂-Werte deutlich wird (Abbildung 28). Der kontinuierliche Anstieg der Herzfrequenz der I/R-Versuchstiere im Verlauf der Versuche (Abbildung 24) kann – parallel zu der Hämokonzentration in den Blutgasanalysen (Tabelle 3) – als Zeichen für

einen Volumenmangel gedeutet werden, welcher durch Flüssigkeitsverschiebungen von intravasal z.B. in die Darmwand und ins Darmlumen zu Stande kommt [Oldenburg *et al.*, 2004], genau wie durch das Einschwemmen toxischer Metabolite aus dem Darm. Eine Tachykardie durch zu flache Narkose wurde durch repetitives Testen von Schmerzreizen an der Hinterpfote ausgeschlossen (Kapitel 2.3.1.1).

Der genaue Mechanismus, mit dem sowohl TAA-1/DMSO als auch DMSO alleine in der Lage sind, den Säure-Basen-Haushalt der Ratte während Ischämie- und Reperfusion zu stabilisieren, ist unklar. Am ehesten ist diesbezüglich ein günstiger Effekt des DMSO anzunehmen, da eine Protektion vorrangig bei den Versuchsgruppen auftrat, die alleinig DMSO erhielten und nur bei der niedrigeren TAA-1 Dosis (0,5 mg/kg KG; Kapitel 3.2.1.3; Abbildungen 25 und 26). Verantwortlich dafür ist möglicherweise die Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion (und der dadurch besseren Gewebeatmung) sowie die Verringerung der Gefäßwandpermeabilität durch geringere Neutrophilenadhäsion durch DMSO (s.o.). Eine verbesserte mikrovaskuläre Perfusion ist für DMSO vorbeschrieben (s.o.). So könnten während der Ischämiezeit die Kapillaren der Kollateralen oder Gefäßanastomosen vermehrt durchblutet werden und so durch Verbesserung der Darmperfusion insgesamt den Zustand der Ratte verbessern. Auch in der Reperfusion könnte dieser verbesserte Blutfluss vor allem in sehr kleinen Gefäßen für einen schnelleren Abtransport von Metaboliten und so für eine raschere Erholung des Gewebes vom ischämischen Schaden sorgen.

4.2.2.2 Toxizität durch DMSO durch Induktion von Hämolyse

In beiden Versuchsserien fielen zum Teil drastisch erhöhte LDH-Aktivitäten im Plasma infolge des Einsatzes von DMSO auf (Kapitel 3.1.1.3 und 3.2.1.4; Abbildungen 19 A und 29 A). Diese Plasmaenzym erhöhungen resultieren sehr wahrscheinlich nicht aus einer durch DMSO vermittelten Schädigung des Dünndarms, da vor allem in den Hauptversuchen die beiden anderen Plasmaenzyme AST und ALT parallel nicht signifikant anstiegen (Kapitel 3.2.1.4; Abbildung 29 B und C). Die isolierte LDH-Erhöhung ist vielmehr als eine bereits bekannte Nebenwirkung der i.v.-Applikation von DMSO, nämlich der Induktion einer Hämolyse bei der Gabe von hohen Dosierungen, zu interpretieren.

Bereits 1964 wiesen DiStefano und Klahn an Katzen nach, dass es vor allem nach intravenöser Gabe von DMSO zu einer deutlichen Hämolyse kommt [DiStefano und Klahn, 1965]. Dieser Effekt war dosisabhängig (höchste kumulative Dosis 4 g/kg i.v.) und abhängig von der Verdünnung: je höher die Verdünnung und je niedriger die Dosis, desto

geringer die Hämolyserate, desto geringer der Abfall des Hämatokrits und desto geringer die Menge des Hämoglobins im Urin. Bei achtfacher Verdünnung oder intraperitonealer Gabe trat – auch bei sehr hohen Dosen – kaum Hämolyse auf [*DiStefano und Klahn*, 1965]. Samoszuk et al. berichteten 1983 von einem klinischen Zwischenfall in Form einer deutlichen Hämolyse mit Hämoglobinurie, die zunächst als Transfusionszwischenfall gedeutet worden war [*Samoszuk et al.*, 1983]. Ein 32-jähriger Mann hatte zuvor zwei Blutkonserven im Rahmen einer Kraniotomie erhalten und erhielt zusätzlich zur Hirnödemtherapie intravenös 1 g/kg 20%ige DMSO-Lösung in Glucose 5%. Antiglobulin-Tests belegten, dass keine Transfusionsreaktion vorlag und nach Ausschluss anderer Ursachen die Hämolyse aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Infusion von DMSO zurückzuführen war.

DeBruijne und van Steveninck zeigten 1972, dass Erythrozyten, die mit bestimmten DMSO-Konzentrationen inkubiert wurden, einen deutlichen K^+ -Ausstrom und eine Zytolyse und damit Hämolyse aufwiesen [*de Bruijne und van Steveninck*, 1972]. Dieses wurde wahrscheinlich verursacht durch Konformationsänderung der zytoplasmatischen Membranlipoproteine und nicht durch eine Zerstörung der Zellmembran per se. Dabei gaben sie verschiedene Schwellenkonzentrationen für verschiedene Spezies an: z.B. für menschliche Erythrozyten 2,8 mol/l DMSO; für Schafererythrozyten 5,6 mol/l DMSO und für Rindererythrozyten 7,0 mol/l DMSO; unterhalb dieser Konzentrationen blieben die Zellen intakt, es kam zu keiner Hämolyse. Osmotische Schwellung wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Die Vor- und Hauptversuche wurden mit DMSO-Dosierungen von 0,002 - 0,43 mol/l durchgeführt (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.3.2; Tabellen 1 und 2). Die genaue DMSO-Schwellendosis für Rattenerothrozyten ist nicht bekannt, und obwohl die eingesetzten Dosierungen die Schwellenkonzentrationen für Erythrozyten anderer Tierarten deutlich unterschritten haben, scheint es dennoch möglich, dass eine Hämolyse zum Zeitpunkt des Kontaktes des DMSO mit der Blutbahn ausgelöst wird, da zu diesem Zeitpunkt lokal höhere Konzentrationen von DMSO erreicht werden. Die niedrigen DMSO-Dosierungen schienen in der Tat auch bei direkter Applikation die Schwelle für eine Hämolyse zu unterschreiten: es wurde nicht vermehrt LDH freigesetzt (Kapitel 3.2.1.4; Abbildung 29 A). Bezüglich einer potentiellen Kaliumfreisetzung durch Hämolyse konnten im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sehr wahrscheinlich induzierte, relativ schwache Hämolyse verringerte anders als in der Arbeit von *DiStefano et al.* den Hämoglobingehalt des Blutes nicht [*DiStefano und Klahn*, 1965]. Am Ende der Ischämie, also nachdem die LDH-Erhöhen maximal waren, fand sich im Vergleich zur I/R-Kontrollgruppe kein

signifikanter Unterschied des Hämoglobinwerts oder Hämatokrits im Blut (Kapitel 3.2.1.3; Tabelle 3).

4.5 Limitationen der Arbeit

Die erste *in vivo*-Applikation von TAA-1 lieferte neue und interessante Ergebnisse über die Wirkung von TAA-1 auf einen lebenden Organismus - jedoch nicht ohne dabei Schwierigkeiten aufzudecken. Eindeutig kompliziert gestaltete sich über beide Versuchsserien hinweg die schlechte Wasserlöslichkeit des TAA-1 sowie der zwingende Gebrauch von DMSO als Lösungsmittel. So entstanden wahrscheinlich stets Mischeffekte durch TAA-1 und DMSO, sodass eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Effekte schwer fällt. Ein inertes Lösungsmittel für TAA-1 (durch welches man auf DMSO und seine zusätzlichen Effekte hätte verzichten können) konnte nicht gefunden werden: Lösungsmittel wie 2-Hydroxylpropyl- β -Cyclodextrin und Cremophor® EL, die der Lösung von hydrophoben Substanzen in wässrigen Lösungen dienen, wurden getestet. 2-Hydroxylpropyl- β -Cyclodextrin löste TAA-1 nur unzureichend, Cremophor® EL in reiner Form löste TAA-1 ausreichend, auch hier kam es jedoch zum Ausfall des TAA-1 sobald 0,9%ige NaCl-Lösung hinzugegeben wurde. Es wurden bisher bei niedriger Dosierung des Cremophor® EL keine toxischen, teratogenen oder embryotoxischen Symptome oder pathologische Veränderungen innerer Organe, jedoch anaphylaktoide Reaktionen beobachtet [BASF, 1997]. Ob Cremophor® EL somit wirklich als inert anzusehen ist, muss bezweifelt werden. Eine wirkliche Verbesserung im Vergleich zu dem über Jahrzehnte deutlich gründlicher untersuchten DMSO ist somit fraglich.

Unklar ist ebenfalls, inwieweit das in DMSO gelöste TAA-1 nach seiner Applikation im Blut ausfällt und so für eine Aufnahme in die Zellen des Darmgewebes in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Ausgefallenes TAA-1 könnte sich ungelöst im Rattenkörper verteilen und wohlmöglich auch durch Ablagerung toxisch wirken. Für eine Toxizität von TAA-1 sprechen v.a. der Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck (Kapitel 3.2.1.1; Abbildung 23), die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten (Kapitel 3.2.2.1; Abbildung 30), der Hämoglobingehalt des Darmhomogenates (Kapitel 3.2.2.3; Abbildung 32) und der Makroscore (Kapitel 3.2.2.4; Abbildung 33): Hier werden positive Effekte von „reinem“ DMSO (200 μ l/kg KG) durch die zusätzliche Applikation von TAA-1 aufgehoben. Andersherum schien TAA-1 in den Vorversuchen partiell die toxischen Effekte von hohen DMSO-Dosen (in Form von Hämolyse) abzumildern – vor allem erkennbar in Abbildung 19 (Kapitel 3.1.1.3; Plasmaenzymaktivitäten von LDH, ALT und AST) und Abbildung 20 (Kapitel 3.1.2.1; Makroscore). Der reduzierte TBARS-Gehalt des Darmhomogenates

(Kapitel 3.2.2.2; Abbildung 31) spricht jedoch dafür, dass ein Teil des TAA-1 von den Zellen des Dünndarms aufgenommen worden ist, seine aktive Form des Katalasemimetikums TAA-1/Fe bilden und so über Chelatisierung von Eisenionen die Lipidperoxidation geringfügig vermindern konnte.

Zum Schluss muss auch bemerkt werden, dass die Versuche aufgrund der eindeutig dunkelbraunen Farbe des TAA-1 nicht geblindet durchgeführt werden konnten. Es war demnach bei der makroskopischen Beurteilung stets klar, welche Versuchsgruppe gerade getestet wurde. Ein gewisser Bias bezüglich der Auswertung kann somit nicht ausgeschlossen werden. Die histologische Befundung wiederum wurde ohne Kenntnis der zugehörigen Versuchsgruppe durchgeführt.

4.6 Ausblick

Trotz der positiven Ergebnisse mit TAA-1 in Zellkulturversuchen mit deutlichem Potential, Zellen vor eisen- und wasserstoffperoxidinduzierter Schädigung zu bewahren, konnte die Schädigung des Rattendünndarms durch Ischämie/Reperfusion nicht effektiv vermindert werden. Hinsichtlich der Durchführung und der richtigen Interpretation der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit stellte die schlechte Wasserlöslichkeit des TAA-1 ein großes Problem dar, weswegen weitere Untersuchungen unabdingbar sind. Ideal wäre es, sollte es durch chemische Modifikationen gelingen, TAA-1 in einer hydrophileren Form herzustellen. So fiel die Notwendigkeit DMSO als Lösungsmittel mit sowohl positiven als auch negativen Effekten verwenden zu müssen weg und es könnte ein eventuell doch vorhandener Schutzeffekt oder eine Toxizität sicher dem TAA-1 zugeschrieben werden. Um zu beweisen, dass TAA-1 wirklich die Zielzellen im Darm erreicht, könnte man in Folgeversuchen die Anwesenheit von TAA-1 im Darmhomogenat messen, beispielsweise durch photometrische Bestimmungen.

Des Weiteren könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, inwiefern eine kontinuierliche intravenöse DMSO-Infusion in sehr niedrigen Konzentrationen bessere Schutzeffekte und eine geringere Toxizität bewirken. Dabei sollte auch eingehender untersucht werden, ob die Plasmaenzymerrhöhung von LDH, aber auch AST und ALT in den Vorversuchen zweifelsfrei auf eine durch DMSO induzierte Hämolyse zurückzuführen ist.

5 Zusammenfassung

Die mesenteriale Ischämie (I) und Reperfusion (R) sowie die dadurch induzierten Schädigungen stellen aufgrund der alternden Bevölkerung mit multimorbiden Patienten ein größer werdendes Problem dar. An der Pathophysiologie des mesenterialen I/R-Schadens sind u.a. reaktive Sauerstoffspezies und chelatisierbare Eisenionen beteiligt.

Das neuartige synthetische Prodrug TAA-1 kann, wie bereits an Zellkulturen gezeigt, intrazellulär Eisenionen (Fe) chelatisieren, dadurch zum aktiven Katalasemimetikum (TAA-1/Fe) werden und so einen effektiven Schutz vor der Zellschädigung z.B. durch Eisenionen und Wasserstoffperoxid vermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde TAA-1 zum ersten Mal *in vivo* am Rattenmodell zur mesenterialen I/R eingesetzt. Dazu wurde TAA-1 in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst intravenös infundiert. Es wurden neben verschiedenen TAA-1-Dosen (0,5 bis 13,4 mg TAA-1/kg Körpergewicht [KG] in DMSO) auch unterschiedliche DMSO-Dosen (10 µl bis 2 ml/kg KG) getestet.

Die Ratten wurden während einer 90-minütigen Ischämie (durch Abklemmen der *A. mesenterica superior*) und 120-minütigen Reperfusion engmaschig (Herz- und Atemfrequenz, Blutdruck, Temperatur) überwacht, es wurden regelmäßig Plasmaenzymaktivitäten gemessen und der Darm nach Versuchsende umfassend (unter anderem makroskopisch und histologisch) untersucht. Eine sich in Vorversuchen abzeichnende mögliche Protektion des TAA-1 (durch geringere Einblutung in den Darm) ließ sich in den notwendigerweise methodisch modifizierten Hauptversuchen nicht bestätigen. Lediglich die Applikation von 0,5 mg TAA-1/kg KG erwies sich hinsichtlich einer verringerten Lipidperoxidation (am ehesten durch Eisenchelation) als protektiv; davon abgesehen konnten eher toxische Wirkungen beobachtet werden. Anders als TAA-1 bewirkte die alleinige Infusion von DMSO positive Effekte. So konnte der Blutdruck in der Reperusionsphase durch 200 µl/kg KG DMSO signifikant stabilisiert werden und es kam zu einer geringeren Infiltration des Darmes mit neutrophilen Granulozyten, am ehesten durch die Verhinderung der Adhärenz an die Gefäßwand. Auch wurde der Säure-Basen-Haushalt stabilisiert, sowie die Einblutung in den Dünndarm verringert. Allein die geringste DMSO-Dosierung reduzierte auch die histologische Schädigung des Darmes. Toxisch erwies sich die DMSO-Gabe durch die Induktion einer temporären Hämolyse mit erhöhten Laktatdehydrogenaseaktivitäten.

Eine zukünftige Applikation von TAA-1 sollte zum Ziel haben, mehr protektive, weniger toxische und besser interpretierbare Effekte unter Verwendung eines möglichst inerten Lösungsmittels für TAA-1 herauszustellen. Eine Infusion von geringen DMSO-Dosierungen birgt Schutzpotential und kann Gegenstand weiterführender Versuche sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (2005): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. München: Elsevier-Verlag.
2. Antony, V. B., Sahn, S. A., Repine, J. E. (1983): Dimethyl sulfoxide inhibits phagocyte influx into infected pleural spaces and phagocyte locomotion in vitro. *Inflammation*. 7(4), 377-385.
3. Arden, W. A., Slocombe, R. F., Stick, J. A., Parks, A. H. (1990): Morphologic and ultrastructural evaluation of effect of ischemia and dimethyl sulfoxide on equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.* 51(11), 1784-1791.
4. Ashwood-Smith, M. J. (1975): Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 243, 246-256.
5. Autzen, S., Korth, H.-G., de Groot, H., Sustmann, R. (2001): Reactions of tetraazamacrocyclic FeIII complexes with hydrogen peroxide - putative catalase mimics? *Eur. J. Org. Chem.* 16, 3119-3125.
6. Aydemir-Koksoy, A., Koksoy, C., Kuzu, M. A., Demirpence, E., Cinel, I., Kesenci, M., Yavuzer, S. (1999): Intestinal ischemia-reperfusion leads to platelet dysfunction. *Thromb. Res.* 94(6), 395-400.
7. Bachmann, C. (1978), Hämoglobin als Methämoglobincyanid. In: R. Richterich, J. P. Colombo and (Eds): *Klinische Chemie: Theorie, Praxis, Interpretation*. 4. Auflage. Basel, München, Paris, London (usw.): Karger: 437-439.
8. Baker, H. J., Lindsey, J. R., Weisbroth, S. H. (1979): *The Laboratory Rat. Volume I. Biology and Diseases*. New York, London, Toronto (usw.): Academic Press; s. bes. S. 80 und 86.
9. BASF (1997): Technical Leaflet: Cremophor® EL. Ludwigshafen: BASF Aktiengesellschaft.
10. Benninghoff, Drenckhahn, D. (2008): *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1. 17. Auflage. München: Elsevier-Verlag; s. bes. S. 671.
11. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. (2004): *Pathologie*. 3. Auflage. München: Elsevier-Verlag.
12. Bolcal, C., Iyem, H., Sargin, M., Mataraci, I., Sahin, M. A., Temizkan, V., Yildirim, V., Demirkilic, U., Tatar, H. (2005): Gastrointestinal complications after cardiopulmonary bypass: sixteen years of experience. *Can. J. Gastroenterol.* 19(10), 613-617.
13. Bradbury, A. W., Brittenden, J., McBride, K., Ruckley, C. V. (1995): Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br. J. Surg.* 82(11), 1446-1459.

14. Brayton, C. F. (1986): Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 76(1), 61-90.
15. Capriotti, K., Capriotti, J. A. (2012): Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 5(9), 24-26.
16. Carati, C. J., Rambaldo, S., Gannon, B. J. (1988): Changes in macromolecular permeability of microvessels in rat small intestine after total occlusion ischemia/reperfusion. *Microcirc. Endothelium Lymphatics.* 4(1), 69-86.
17. Caujolle, F. M., Caujolle, D. H., Cros, S. B., Calvet, M. M. (1967): Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141(1), 110-126.
18. Cerqueira, N. F., Hussni, C. A., Yoshida, W. B. (2005): Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir. Bras.* 20(4), 336-343.
19. Chiu, C. J., McArdle, A. H., Brown, R., Scott, H. J., Gurd, F. N. (1970): Intestinal mucosal lesion in low-flow states. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch. Surg.* 101(4), 478-483.
20. Chow, L. C., Chan, F. P., Li, K. C. (2002): A comprehensive approach to MR imaging of mesenteric ischemia. *Abdom. Imaging.* 27(5), 507-516.
21. Cudnik, M. T., Darbha, S., Jones, J., Macedo, J., Stockton, S. W., Hiestand, B. C. (2013): The diagnosis of acute mesenteric ischemia: a systematic review and meta-analysis. *Acad. Emerg. Med.* 20(11), 1087-1100.
22. Dabareiner, R. M., White, N. A., Snyder, J. R., Feldman, B. F., Donaldson, L. L. (2005): Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and the 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion. *Am. J. Vet. Res.* 66(3), 525-536.
23. David, N. A. (1972): The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Annu. Rev. Pharmacol.* 12, 353-374.
24. de Bruijne, A. W., van Steveninck, J. (1972): Lysis of yeast cells and erythrocytes by dimethylsulfoxide. *Biochem. Pharmacol.* 21(2), 153-162.
25. de Groot, H. (2005): Die Schädigung viszeraler Organe durch Ischämie und Reperfusion. Abläufe in pathogenetischen Netzwerken. *Zentralbl. Chir.* 130(3), 202-212.
26. de Groot, H., Rauen, U. (2007): Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant. Proc.* 39(2), 481-484.
27. de Groot, H., Auferkamp, O., Bramey, T., de Groot, K., Kirsch, M., Korth, H. G., Petrat, F., Sustmann, R. (2006): Non-oxygen-forming pathways of hydrogen peroxide degradation by bovine liver catalase at low hydrogen peroxide fluxes. *Free Radic. Res.* 40(1), 67-74.
28. Del Maestro, R. F., Björk, J., Arfors, K. E. (1981): Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals I. *In vivo* study II. Role

- of superoxide anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. *Microvasc. Res.* 22(3), 239-270.
29. Demetriou, A. A., Kagoma, P. K., Kaiser, S., Seifter, E., Niu, X. T., Levenson, S. M. (1985): Effect of dimethyl sulfoxide and glycerol on acute bowel ischemia in the rat. *Am. J. Surg.* 149(1), 91-94.
 30. DiStefano, V., Klahn, J. J. (1965): Observations on the pharmacology and hemolytic activity of dimethyl sulfoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7(5), 660-666.
 31. Esterbauer, H., Cheeseman, K. H. (1990): Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-421.
 32. Fazekas, A. S., Funk, G. C., Klobassa, D. S., R  ther, H., Ziegler, I., Zander, R., Semmelrock, H. J. (2013): Evaluation of 36 formulas for calculating plasma osmolality. *Intensive Care Med.* 2013(2), 302-308.
 33. Geertzen, J. H., de Bruijn, H., de Bruijn-Kofman, A. T., Arendzen, J. H. (1994): Reflex sympathetic dystrophy: early treatment and psychological aspects. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 75(4), 442-446.
 34. Gianello, P., Saliez, A., Bufkens, X., Pettinger, R., Misseleyn, D., Hori, S., Malfroy, B. (1996): EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, protects rat kidneys from ischemia-reperfusion-induced damage. *Transplantation.* 62(11), 1664-1666.
 35. Grisham, M. B., Hernandez, L. A., Granger, D. N. (1986): Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.* 251, G567-574.
 36. Gutteridge, J. M., Richmond, R., Halliwell, B. (1979): Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 184(2), 469-472.
 37. Haller, J., Trachy, R., Cummings, C. W. (1987): Effect of dimethyl sulfoxide on island flap perfusion and survival in rats. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 113(8), 859-863.
 38. Hebel, R., Stromberg, M. W. (1986): *Anatomy and embryology of the laboratory rat.* W  rthsee: BioMed Verlag; s. bes. S. 108.
 39. Hernandez, L. A., Grisham, M. B., Twohig, B., Arfors, K. E., Harlan, J. M., Granger, D. N. (1987): Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am. J. Physiol.* 253(3 Pt 2), H699-703.
 40. Hucker, H. B., Ahmad, P. M., Miller, E. A. (1966): Absorption, distribution and metabolism of dimethylsulfoxide in the rat, rabbit and guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 154(1), 176-184.

41. Jacob, S. W., Herschler, R. (1986): Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*. 23(1), 14-27.
42. Jolly, S. R., Kane, W. J., Bailie, M. B., Abrams, G. D., Lucchesi, B. R. (1984): Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.* 54(3), 277-285.
43. Keberle, H. (1964): The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 119, 758-768.
44. Kedar, I., Jacob, E. T., Bar-Natan, N., Ravid, M. (1983): Dimethyl sulfoxide in acute ischemia of the kidney. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 411, 131-134.
45. Kehrer, J. P. (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 149(1), 43-50.
46. Khadaroo, R. G., Fortis, S., Salim, S. Y., Streutker, C., Churchill, T. A., Zhang, H. (2014), I-FABP as biomarker for the early diagnosis of acute mesenteric ischemia and resultant lung injury, *PLoS One* 9(12), 1-16. Online Publikation: e115242.doi:10.1371/journal.pone.0115242.
47. Kurose, I., Argenbright, L. W., Wolf, R., Lianxi, L., Granger, D. N. (1997): Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am. J. Physiol.* 272(6 Pt 2), H2976-2982.
48. Kvietys, P. R., Inauen, W., Bacon, B. R., Grisham, M. B. (1989): Xanthine oxidase-induced injury to endothelium: role of intracellular iron and hydroxyl radical. *Am. J. Physiol.* 257(5 Pt 2), H1640-1646.
49. Lelli, J. L., Pradhan, S., Cobb, L. M. (1993): Prevention of postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *J. Surg. Res.* 54(1), 34-38.
50. Leone, M., Bechis, C., Baumstarck, K., Ouattara, A., Collange, O., Augustin, P., Annane, D., Arbelot, C., Asehnoune, K., Baldési, O., Bourcier, S., Delapierre, L., Demory, D., Hengy, B., Ichai, C., Kipnis, E., Brasdefer, E., Lasocki, S., Legrand, M., Mimoz, O., Rimmelé, T., Aliane, J., Bertrand, P. M., Bruder, N., Klasen, F., Friou, E., Lévy, B., Martinez, O., Peytel, E., Piton, A., Richter, E., Toufik, K., Vogler, M. C., Wallet, F., Boufi, M., Allaouchiche, B., Constantin, J. M., Martin, C., Jaber, S., Lefrant, J. Y. (2015): Outcome of acute mesenteric ischemia in the intensive care unit: a retrospective multicenter study of 780 cases. *Intensive Care Med.* 41(4), 667-676.
51. Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A. J., Plebani, M. (2008): Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46(6), 764-772.
52. Löffler, G., Petrides, P. E. (2003): *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; s. bes. S. 551, 552, 653, 981.

53. Lutz, J., Augustin, A., Friedrich, E. (1990): Severity of oxygen free radical effects after ischemia and reperfusion in intestinal tissue and the influence of different drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 277, 683-690.
54. Mallick, I. H., Yang, W., Winslet, M. C., Seifalian, A. M. (2004): Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig. Dis. Sci.* 49(9), 1359-1377.
55. Mensink, P. B., Hol, L., Borghuis-Koertshuis, N., Geelkerken, R. H., Huisman, A. B., Doelman, C. J., van Vuuren, A. J., Kuipers, E. J., Kolkman, J. J. (2009): Transient postprandial ischemia is associated with increased intestinal fatty acid binding protein in patients with chronic gastrointestinal ischemia. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21(3), 278-282.
56. Mirkovitch, V., Winistörfer, B. (1987): Effect of dimethyl sulfoxide on the function and structure of the intact and ischemic canine ileum. *Res. Exp. Med.* 187, 295-302.
57. Müller, M. (2008/2009): *Chirurgie für Studium und Praxis*, 9. Auflage. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
58. Oldenburg, W. A., Lau, L. L., Rodenberg, T. J., Edmonds, H. J., Burger, C. D. (2004): Acute mesenteric ischemia. *Arch. Intern. Med.* 164, 1045-1062.
59. Omar, R., Nomikos, I., Piccorelli, G., Savino, J., Agarwal, N. (1989): Prevention of postischemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut.* 30(4), 510-514.
60. Park, P. O., Haglund, U., Bulkley, G. B., Fält, K. (1990): The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 107(5), 574-580.
61. Parks, D. A., Shah, A. K., Granger, D. N. (1984): Oxygen radicals: effects on intestinal vascular permeability. *Am. J. Physiol.* 247(2 Pt 1), G167-170.
62. Paschke, J., Kirsch, M., Korth, H. G., de Groot, H., Sustmann, R. (2001): Catalase-like activity of a non-heme dibenzotetraaza[14]annulene-Fe(III) complex under physiological conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 123(44), 11099-11100.
63. Peterson, C. G., Robertson, R. D. (1967): A pharmacodynamic study of dimethyl sulfoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141(1), 273-276.
64. Petrat, F., de Groot, H. (2011), Protection against severe intestinal ischemia/reperfusion injury in rats by intravenous resveratrol, *J. Surg. Res.* 167(2), e145-e155. Online-Publikation: doi: 10.1016/j.jss.2010.06.004. Epub 2010 Jun 29.
65. Petrat, F., Swoboda, S., de Groot, H., Schmitz, K. J. (2010): Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score. *J. Invest. Surg.* 23(4), 208-217.

66. Pschyrembel, W., Dornblüth, O. (2004): *Klinisches Wörterbuch*, 260. Auflage. Berlin: Walter de Gruyter
67. Quaedackers, J. S., Beuk, R. J., Bennet, L., Charlton, A., oude Egbrink, M. G., Gunn, A. J., Heineman, E. (2000): An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transplant. Proc.* 32(6), 1307-1310.
68. Rao, P. S., Cohen, M. V., Mueller, H. S. (1983): Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15(10), 713-716.
69. Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2004a): Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* 40(4), 607-615.
70. Rauen, U., Li, T., Sustmann, R., de Groot, H. (2004b): Protection against iron- and hydrogen peroxide-dependent cell injuries by a novel synthetic iron catalase mimic and its precursor, the iron-free ligand. *Free Radic. Biol. Med.* 37(9), 1369-1383.
71. Rauen, U., Kettler-Thiel, T., de Groot, H., Korth, H. G., Sustmann, R. (2009): Conversion of the synthetic catalase mimic precursor TAA-1 into the active catalase mimic in isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Drug Des.* 73(5), 494-501.
72. Ravid, M., Van-Dyk, D., Bernheim, J., Kedar, I. (1983): The protective effect of dimethyl sulfoxide in experimental ischemia of the intestine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 411, 100-104.
73. Romson, J. L., Hook, B. G., Kunkel, S. L., Abrams, G. D., Schork, M. A., Lucchesi, B. R. (1983): Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 67(5), 1016-1023.
74. Rosenblum, W. (1983): Dimethyl sulfoxide effects on platelet aggregation and vascular reactivity in pial microcirculation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 411, 110-119.
75. Saeed, S. A., Karimi, S. J., Suria, A. (1988): Differential effects of dimethyl sulfoxide on human platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 40(2), 143-150.
76. Sahin, M., Avsar, F. M., Ozel, H., Topaloglu, S., Yilmaz, B., Pasaoglu, H., Avunduk, M. C., Erikoglu, M., Hengirmen, S. (2004): The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.* 36(9), 2590-2592.
77. Salim, A. S. (1991): Protection against stress-induced acute gastric mucosal injury by free radical scavengers. *Intensive Care Med.* 17(8), 455-460.
78. Samoszuk, M., Reid, M. E., Toy, P. T. (1983): Intravenous dimethylsulfoxide therapy causes severe hemolysis mimicking a hemolytic transfusion reaction. *Transfusion.* 23(5), 405.

79. Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C. (2003): Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 65(7), 1035-1041.
80. Sekizuka, E., Benoit, J. N., Grisham, M. B., Granger, D. N. (1989): Dimethylsulfoxide prevents chemoattractant-induced leukocyte adherence. *Am. J. Physiol.* 256(2 Pt 2), H594-597.
81. Shimizu, S., Simon, R. P., Graham, S. H. (1997): Dimethylsulfoxide (DMSO) treatment reduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 239(2-3), 125-127.
82. Shlafer, M., Kane, P. F., Kirsh, M. M. (1982): Effects of dimethyl sulfoxide on the globally ischemic heart: possible general relevance to hypothermic organ preservation. *Cryobiology.* 19(1), 61-69.
83. Smith, E. R., Hadidian, Z., Mason, M. M. (1967): The single - and repeated - dose toxicity of dimethyl sulfoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141(1), 96-109.
84. Sustmann, R., Korth, H. G., Kobus, D., Baute, J., Seiffert, K. H., Verheggen, E., Bill, E., Kirsch, M., de Groot, H. (2007): Fe(III) complexes of 1,4,8,11-tetraaza[14]annulenes as catalase mimics. *Inorg. Chem.* 46(26), 11416-11430.
85. Toledo-Pereyra, L. H., Lopez-Neblina, F., Toledo, A. H. (2004): Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann. Transplant.* 9(1), 81-83.
86. Turnage, R. H., Magee, J. C., Guice, K. S., Myers, S. I., Oldham, K. T. (1994): Complement activation by the hydroxyl radical during intestinal reperfusion. *Shock.* 2(6), 445-450.
87. Walensi, M. J., de Groot, H., Schulz, R., Hartmann, M., Petrat, F. (2013), Mesenteric ischemia-reperfusion injury: clearly improved hemodynamics but only minor protection of the rat small intestine by (sub)therapeutic heparin sodium and enoxaparin doses., *J. Surg. Res.* 179(1), e57-69. Online-Publikatin: doi: 10.1016/j.jss.2012.01.002. Epub 2012 Apr 1.
88. White, B. C., Krause, G. S., Aust, S. D., Eyster, G. E. (1985): Postischemic tissue injury by iron-mediated free radical lipid peroxidation. *Ann. Emerg. Med.* 14(8), 804-809.
89. Yeo, C. J., Dempsey, D. T., Klein, A. S., Pemberton, J. H., Peters, J. H. (2007): Shackelford's surgery of the alimentary tract. Volume I. 6. Auflage. Philadelphia: Saunders Elsevier-Verlag; s. bes. S. 1248.
90. Zimmerman, B. J., Grisham, M. B., Granger, D. N. (1990): Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am. J. Physiol.* 258(2 Pt 1), G185-190.

7 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Base Excess
Ca^{2+}	Kalzium
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)ethansulfonsäure
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
I	Ischämie
i.p.	intraperitoneal, in die Bauchhöhle
i.v.	intravenös, in die Vene
K^+	Kalium
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP	Mean arterial pressure; mittlerer arterieller Blutdruck
Na^+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
O_2	Sauerstoff
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
OH^-	Hydroxidion
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidanion
R	Reperfusion
ROS	Reactive Oxygen Species; reaktive Sauerstoffspezies
s.c.	subcutan, unter die Haut

SEM	Standard error of the mean; Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
TAA-1	(di(2,2-dimethyl[1,3]dioxolo)benzo[b,i]-1,4,8,11tetraazacyclo-tetradeca-2,4,6,9,11-hexaen); Eisenchelator
TAA-1/Fe	aktives Katalasemimetikum
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances; Thiobarbitursäure reaktive Substanzen

8 Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen erstellt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Herbert de Groot (†) für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stete Begleitung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Petrat für die jederzeitige Bereitschaft, sein enormes Fachwissen und seine ausgeprägte Fähigkeit zur Problemlösung auch mir zuteilwerden zu lassen. Insbesondere bedanke ich mich bei ihm für seine immer geduldige Betreuung der experimentellen und schriftlichen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Reiner Sustmann (†) und Dr. rer. nat. Hans-Gert Korth für die freundliche Bereitstellung des TAA-1 auch für meine Arbeit.

Frau Angela Ballato, Herrn Falk Kähler, Frau Natalie Boschenkov für die Einarbeitung in die Operations- und Messmethoden und ihre stetige Hilfestellung.

Der Forschungsförderung der Universität Duisburg-Essen für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des IFORES-Promotionsprogrammes.

9 Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.